



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

DORIAN LARRIEU

Le 21 octobre 2019

**Régulation et fonctions de l'E3 ubiquitine ligase TRIP12 au cours
du cycle cellulaire**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Marlène DUFRESNE et Jérôme TORRISANI

Jury

Pr. Hervé Prats, Examineur

Dr. Anna Castro, Rapporteur

Dr. Claude Prigent, Rapporteur

Dr. Izabela Sumara, Rapporteur

Dr. Marlène Dufresne, Directrice de thèse

Dr. Jérôme Torrisani, Co-directeur de thèse

Remerciements

Je ne commencerai pas mes remerciements en citant une personne en particulier. En effet, je tiens en premier lieu à remercier toutes les personnes faisant des dons à la Ligue Nationale contre le Cancer et qui ont permis à cette thèse de voir le jour.

Je remercie les membres du jury : les Drs. Anna Castro, Claude Prigent, Izabela Sumara et le Pr. Hervé Prats qui me font l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse. Je tiens à vous exprimer ma plus sincère reconnaissance pour le temps que vous y avez accordé et vos commentaires.

A mes Directeurs de thèse les Drs. Marlène Dufresne et Jérôme Torrisani, merci de m'avoir accompagné, conseillé, soutenu et aidé tout au long de ces 4 années de thèse. Vous avoir comme encadrants est une chance inouïe. Votre pédagogie, vos qualités scientifiques et personnelles font de vous des directeurs de thèse exceptionnels. Vous êtes toujours présents, à l'écoute et partants pour de longues discussions sur le projet, mais pas que ! Votre implication est aussi retrouvée à la paillasse puisque vous en êtes encore très proches vous permettant de comprendre et de résoudre nos problèmes techniques.

Marlène, merci d'être autant passionnée par TRIP12 ce qui rendait nos discussions très intéressantes et complètes, également grâce à ton très bon esprit critique. Ta maîtrise de l'écriture française est incroyable (j'ai quand même appris pas mal de trucs). Mais surtout, tu as toujours de très bons conseils artistiques pour les Power-Point. Je voulais personnellement te remercier pour m'avoir toujours encouragé à ne rien lâcher et toujours soutenu que ce soit sur le plan professionnel ou personnel (et je ne l'oublierai pas). Ton côté humain, ton empathie et sans oublier la phrase mythique « Aaaaah si tu avais été mon fils » m'ont permis de tenir dans les moments difficiles.

Jérôme, je me souviens encore de nos discussions jusqu'à des heures tardives pendant mon stage de M2 où tu comparais les étapes à franchir pour avoir un financement de thèse à des qualifications pour la Champions League jusqu'à la finale (la thèse). Tu m'encourageais même pendant mes longues cinématiques le soir en allant chercher des pizzas (tu avais déjà bien cerné le personnage). Tu m'as toujours poussé à être au point grâce à nos discussions sur TRIP12 et sa vie. Tu es très bon pédagogue que ce soit à la paillasse ou sur un terrain de rugby. Tu as su me rendre meilleur dans ces deux domaines. Je t'en remercie énormément. J'ai également beaucoup apprécié nos conversations en tout genre de fin de journée. Sans oublier bien sûr les Pool Euro et Coupe du monde du CRCT que nous coorganisons en faveur d'associations permettant de fédérer une grande partie du centre autour d'une bonne cause.

Je tiens également à remercier le Dr. Pierre Cordelier pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci d'avoir fait avancer le projet TRIP12 pendant les réunions d'équipe grâce à tes questions toujours pertinentes. Merci d'avoir toujours fait de ton possible pour qu'une bonne ambiance règne. Etant une équipe de gourmands tu ne ratais jamais l'occasion de nous ramener de quoi grignoter de tes congrès. Merci aussi pour m'avoir permis de prendre part à une des plus belles expériences de ma thèse tant sur le plan scientifique que personnel : la Summer School au Brésil. Sans oublier également ton énorme contribution afin que je sois prêt physiquement pour cette soutenance, j'espère que le fractionné aura été efficace.

Aux membres de mon comité de thèse les Drs. Florence Larminat et Philippe Soubeyran, merci pour le temps accordé et vos conseils pour faire avancer mon projet de thèse.

Aux doctorantes de l'équipe (et oui, j'étais le seul garçon), merci pour votre soutien, nos rires, nos débats scientifiques et personnels. Audrey, merci pour tous les bons gâteaux que tu nous as confectionné et qui me remontaient toujours le moral. Je n'oublie pas non plus tes pizzas maisons et toutes nos discussions geek. La petite anecdote du dentifrice dans un paquet de mouchoir qu'on a dû se partager en congrès me fait toujours autant rire et je ne l'oublierai pas. Audrey Lulu, je ne compte même plus les fous rires qu'on a pu avoir ensemble. J'adorais le lundi car on se parlait mutuellement de nos week-ends qui sont très similaires ! Je n'oublie pas non plus, la marche digestive après le repas pour faire éclore nos œufs. Lolo dixit « la meilleure », surnom que tu t'es donné quand tu as enregistré ton numéro de téléphone dans le mien. La meilleure en punchline et en anglais je te l'accorde, le reste....JOKE ! Ça va me manquer de ne plus pouvoir te faire peur entrant en douce dans ton bureau ou simplement en faisant « BOUH » à côté de toi. Claire, j'ai adoré t'encadrer au début de ton Master 2, je pense qu'apprendre en s'amusant résume bien la manière dont je t'ai « formée ». Toujours de bonne humeur, tu vas apporter du pep's à l'équipe et je suis content que tu reprennes le flambeau TRIP12 et interaction avec l'ADN. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse. Enfin Manon, que dire en si peu de lignes. A mes yeux tu as été ma stagiaire, ma collègue de bureau, ma collègue doctorante, mon amie et ma « petite sœur du labo ». Cette thèse sans toi ça n'aurait pas été la même histoire. Toujours à se soutenir mutuellement pour notre TRIP12 adorée, mais aussi dans nos moments difficiles. Nos vendredis après-midi (biblio et cahier de labo entres autres) vont beaucoup me manquer. Mais surtout félicitations pour avoir réussi à m'apprendre à danser, j'étais pratiquement une cause perdue. Merci pour tout et tu vas tout déchirer dans cette dernière année de thèse, je penserai à toi !

Je ne vous ai pas oubliés Naima et Hubert, les meilleurs de l'équipe pour la fin. Vous êtes les parents du labo, sans vous nous serions tous perdus. Mention spéciale à Naima qui a souvent dû faire la maman dans le bureau pour arrêter nos « disputes ». Delphine, tu n'as jamais vraiment quitté l'équipe, donc tu as droit de faire partie de ce paragraphe. Merci de m'avoir toujours encouragé et de m'avoir « supporté » dans le bureau. Le moment mythique de la poubelle reste gravé à jamais dans ma tête.

Je voulais également remercier le plateau technologique du CRCT, notamment Manon et Laetitia pour leur aide précieuse en cytométrie et en microscopie. Plus particulièrement Nathalie et Laetitia pour nos discussions scientifiques ou moins scientifiques, c'était toujours très agréable.

Merci également à toi Guillaume, je t'ai connu lors de mon stage de Master 1 et on ne s'est jamais vraiment quittés vu qu'on s'est retrouvés voisins d'équipe quand j'ai commencé ma thèse. Merci pour tous les conseils que tu as pu me donner, quand j'étais jeune padawan. Merci pour les soirées jeux de sociétés et surtout l'organisation du Touch Rugby. Faire partie de cette équipe permettait de rebooster ma journée et ma fin de semaine.

A mes amis,

Christophe, Romain, Mathieu et Rémi vous savez déjà tout ce que je pense de vous mais encore une fois merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vous avez toujours su vous rendre disponibles pour me faire « oublier » le labo et que je puisse me déconnecter le week-end. Mais vous étiez aussi présents pour me booster quand il le fallait. Merci pour tout.

Mes frères Ksi, il n'existe pas de mots pour vous transcrire tout ce que je pense de vous. Seulement merci pour tous ces week-ends, notamment ceux dans le Gers.

Merci aux membres du groupe KsiOmegamicro Gaming : Romain, Joffrey, Brice, Benoit et Benjy pour nos soirées et week-ends geek. Merci également à Denis pour nos parties endiablées sur Rocket League.

Aux amis de la Fac, Justine, Christelle, Yohan, Lise, Romain, Martial, Céline, Pupu et Victor. Merci pour toutes nos soirées à la Tantina et nos pique-niques. Tous ces bons moments partagés au long de ma thèse et même avant ont été très importants pour moi, merci pour tout ça.

A mes voisins Tony et Pauline, quel bonheur d'avoir pu aménager au début de ma thèse dans le même immeuble que vous. Nos soirées voisins du dimanche soir me permettaient toujours d'aborder le début de semaine de bonne humeur.

A ma famille,

Mes parents, merci de m'avoir toujours poussé à donner le meilleur de moi-même et m'avoir encouragé dans tous mes choix d'études.

Geneviève et Norbert, merci pour vos attentions, votre intérêt et votre gentillesse.

Pauline, notre première année de licence semble bien loin. On avait un rêve commun, faire une thèse au Centre de Recherches en Cancérologie qui était en train de se construire. 9 ans après nous y sommes, ensemble nous allons réaliser ce rêve avec une semaine d'écart. Je te laisse passer la première pour ne pas avoir à subir ton stress si j'avais eu mon doctorat avant toi, on est d'accord sur ça. Merci d'avoir partagé tous ces moments importants avec moi et d'avoir toujours su trouver les mots quand ça n'allait pas. L'aventure ne fait que débuter.

Sommaire

Résumé	1
Abstract	2
Liste des abréviations	3
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	10
INTRODUCTION	12
I. Le cycle cellulaire	14
I.1. Le déroulement du cycle cellulaire	14
I.2. Les kinases dépendantes des cyclines (CDKs)	14
I.2.a Les complexes CDK-cyclines au cours du cycle cellulaire	14
I.2.b La régulation des complexes CDK-cyclines	15
I.2.b.1 Le niveau d'expression des cyclines	16
I.2.b.2 Le statut de phosphorylation des CDKs.....	16
I.2.b.3 La liaison aux inhibiteurs des CDKs (CKI).....	17
I.3. Les étapes du cycle cellulaire	18
I.3.a La phase G ₁	18
I.3.a.1 La progression en G ₁	18
I.3.a.2 La fin de G ₁ : préparation de la transition G ₁ /S.....	19
I.3.a.3 La transition G ₁ /S.....	20
I.3.b La phase S.....	21
I.3.b.1 La formation du réplisome.....	21
I.3.b.2 Le contrôle temporel de la réplication	22
I.3.c La phase G ₂	23
I.3.c.1 Les rôles de la cycline A2 dans l'activation du complexe Cycline B1/CDK1	23
I.3.d La mitose.....	24
I.3.d.1 La prophase.....	25
I.3.d.1.a Les changements dans le noyau	25
I.3.d.1.b Les changements dans le cytoplasme.....	26
I.3.d.1.c L'importance de la restructuration pendant la prophase	27
I.3.d.2 La prométaphase.....	27
I.3.d.2.a La mise en place du fuseau mitotique et l'attachement des chromosomes	27
I.3.d.2.b Le point de contrôle du fuseau mitotique.....	29
I.3.d.3 La métaphase	30
I.3.d.3.a Le complexe APC/C.....	30

I.3.d.4 L'anaphase	31
I.3.d.5 La télophase	32
I.3.d.5.a La reformation de l'enveloppe nucléaire.....	32
I.3.d.5.b La décondensation des chromosomes et la cytotélorèse	33
I.4 Les erreurs de ségrégation des chromosomes	34
I.4.a Les défauts de symétrie du fuseau mitotique	34
I.4.b Les défauts de ségrégation des chromatides sœurs	35
I.4.b.1 Les ponts anaphasiques ou anaphase bridges	35
I.4.b.2 Les chromosomes retardataires ou chromosome lagging	36
I.4.b.3 Le dérapage mitotique ou mitotic slippage	36
I.4.c Les traces des erreurs mitotiques en interphase	37
I.4.d L'impact des erreurs de ségrégation des chromosomes dans la tumorigénèse.....	37
II. L'E3 ubiquitine ligase TRIP12.....	38
II.1 L'ubiquitination.....	38
II.1.a La cascade d'ubiquitination	38
II.1.b Les différents types d'ubiquitination et leurs rôles physiologiques	39
II.1.b.1 Les chaînes liées par les lysines 48 : polyubiquitination K48.....	41
II.1.b.2 Les chaînes liées par les lysines 11 : polyubiquitination K11	41
II.1.b.3 Les chaînes liées par les lysines 63 : polyubiquitination K63.....	41
II.1.b.4 Les chaînes liées par les lysines 6 : polyubiquitination K6	41
II.1.b.5 Les chaînes liées par les lysines 27 : polyubiquitination K27	42
II.1.b.6 Les chaînes liées par les lysines 29 : polyubiquitination K29.....	42
II.1.b.7 Les chaînes liées par les lysines 33 : polyubiquitination K33.....	42
II.2 Les E3 ubiquitine ligases	43
II.2.a Les différentes familles	43
II.2.a.1 Les E3 ubiquitine ligases de la famille RING	44
II.2.a.2 Les E3 ubiquitine ligases de la famille HECT	45
II.2.a.3 Les E3 ubiquitine ligases de la famille RBR.....	45
II.2.b Les dérégulations de l'ubiquitination dans les cancers.....	46
II.2.b.1 Les mécanismes dérégulant l'ubiquitination dans le cancer	46
II.2.b.2 Les processus affectés par une dérégulation des E3 dans le cancer.....	48
II.2.b.3 Le ciblage des E3 ubiquitine ligases, une approche thérapeutique du cancer	49
II.3 La découverte et la structure de la protéine TRIP12.....	51
II.3.a La découverte de la protéine	51
II.3.b L'expression et la structure protéique de la protéine TRIP12.....	51
II.3.b.1 L'expression de l'ARNm et de la protéine TRIP12 chez l'Homme	51

II.3.b.2 La structure de la protéine TRIP12.....	52
II.3.b.3 La conservation de la protéine TRIP12 entre les espèces	53
II.3.b.4 Les modifications post-traductionnelles de la protéine TRIP12	54
II.4 Les fonctions de la protéine TRIP12.....	55
II.4.a Le rôle de la protéine TRIP12 dans le cancer du pancréas.....	55
II.4.b Le rôle de la protéine TRIP12 dans la voie de signalisation ARF/p53	56
II.4.b.1 Dans une cellule normale.....	56
II.4.b.2 Dans les cancers	58
II.4.b.2.a Dans les leucémies aigües myéloïdes.....	58
II.4.b.2.b Dans le cancer hépatique	58
II.4.b.2.c Dans le cancer gastrique	59
II.4.c Les rôles de la protéine TRIP12 dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	59
II.4.c.1 Par la voie ARF/p53	59
II.4.c.2 Par le contrôle de l'ubiquitination des histones	59
II.4.c.3 Par la déubiquitinase USP7	61
II.4.d Les rôles de TRIP12 dans le remodelage de la chromatine	61
II.4.d.1 Par le contrôle de l'intégrité du complexe SWI/SNF	61
II.4.d.2 Par la préservation de gènes mis sous silence par le complexe Polycomb	63
II.5 Les altérations du gène <i>Trip12</i>	65
II.5.a Les altérations du gène <i>Trip12</i> dans la déficience intellectuelle et l'autisme.....	65
II.5.b Les mutations du gène <i>Trip12</i> dans les cancers	67
RESULTATS EXPERIMENTAUX	70
I. Introduction générale : Rationnel de thèse	72
II. Publication en cours	74
II.1 « TRIP12 regulates mitotic entry and chromosome stability »	74
DISCUSSION	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126

Résumé

TRIP12 est une E3 ubiquitine ligase de la famille HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*). TRIP12 a plusieurs cibles connues qu'elle adresse au protéasome par polyubiquitination. Parmi ces cibles, plusieurs protéines ont des rôles importants dans la réponse aux dommages à l'ADN, le remodelage de la chromatine et la voie d'activation de p53. Des résultats non publiés de mon équipe d'accueil ont montré une surexpression de la protéine TRIP12 dans le cancer du pancréas et les lésions prénéoplasiques. Le groupe a mis en évidence que TRIP12 polyubiquitine et provoque la dégradation du facteur de transcription PTF1a (*Pancreas Transcription Factor 1a*), décrivant pour la première fois un mécanisme de régulation post-traductionnelle de PTF1a. PTF1a est essentiel au développement et à l'homéostasie du pancréas. Il est capable d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses pancréatiques et est considéré comme un gène suppresseur de tumeur. Bien qu'ayant pour substrats des protéines intervenant dans des processus finement régulés au cours du cycle cellulaire et altérés dans les cancers, la régulation de l'expression et les fonctions de TRIP12 au cours du cycle cellulaire n'étaient pas connues au début de mes travaux de thèse. J'ai démontré que l'expression et la localisation nucléaire de TRIP12 varient au cours du cycle cellulaire. J'ai identifié un domaine intrinsèquement désordonné dans la partie N-terminale de TRIP12 qui lui permet d'interagir avec l'euchromatine. J'ai montré que TRIP12 est impliqué dans l'entrée en mitose en contrôlant la durée de la réplication de l'ADN indépendamment de son activité catalytique. TRIP12 est également indispensable pour une bonne progression en mitose et la stabilité chromosomique. Mes résultats proposent TRIP12 comme une nouvelle protéine associée à la chromatine, essentielle à la progression dans le cycle cellulaire et au maintien de l'intégrité du génome.

A terme, ce travail de thèse servira de base pour comprendre la surexpression de TRIP12 dans le cancer du pancréas et son impact dans la carcinogénèse.

Abstract

TRIP12 is an E3 ubiquitin ligase that belongs to the HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*) family. Several proteins are targeted by TRIP12 polyubiquitination which triggers their proteasomal degradation. Among its targets, several proteins are involved in DNA damage responses, chromatin remodelling and p53 pathway activation. Unpublished results of my team showed an increased expression of TRIP12 in pancreatic cancer and pre-neoplastic lesions. My group revealed that TRIP12 polyubiquitinates and provokes the degradation of the transcription factor PTF1a (*Pancreas Transcription Factor 1a*) stability. Describing for the first time a post-translational regulation of PTF1a. PTF1a is essential in pancreatic development and homeostasis. It inhibits the proliferation of pancreatic cells and is considered as a tumour suppressor gene and. Even if several TRIP12 targets are involved in cellular processes that are tightly cell cycle regulated, the regulation of TRIP12 expression and its functions during the cell cycle was unknown at the beginning of my thesis. I showed that TRIP12 expression and nuclear localization are regulated throughout the cell cycle. I identified an intrinsically disordered domain within the N-terminal region of TRIP12 that permits its interaction to euchromatin. I demonstrated TRIP12 implication in mitosis entry by controlling DNA replication timing Independently of its catalytic activity. TRIP12 is also required for maintaining a correct mitotic progression and chromosomes stability. My results propose TRIP12 as a new chromatin-associated protein that is essential for cell cycle progression and to preserve genome integrity.

In the end, my studies will be fundamental to explain the increased expression of TRIP12 protein observed in pancreatic cancer and its impact in carcinogenesis.

Liste des abréviations

A

ADN Acide désoxyribonucléique

ADNsb ADN simple brin

AMFR Autocrine motility factor receptor

AMPK AMP-activated protein kinase

APC/C Anaphase promoting complex/Cyclosome

APP-BP1 Amyloïd precursor protein-binding protein1

AREL1 Apoptosis-resistant E3 ubiquitin ligase 1

ARF Alternative reading frame

ASXL1 Additional sex combs like 1

ATP Adénosine triphosphate

B

BAF Brg-associated factor

BAP1 BRCA1 associated protein 1

BRCA1 Breast cancer 1

BRD4 Bromodomain-containing protein 4

BUB Budding uninhibited by benzimidazole

C

CagA Cytotoxin-associated gene A

CAK CDK activating kinase

CBP Cyclic-AMP response element-binding protein (CREB)-binding protein

CDC6 Cell division cycle 6

CDC25 Cell division cycle 25

CDC45 Cell division cycle 45

CDK Cyclin dependent kinase

Cdt1 Chromatin licensing and DNA replication factor 1

CIP CDK-interactiong protein

CKI Cyclin dependent kinase inhibitor

CNA Copy number alteration

CP Cancer du pancréas

CRBN Cereblon

CYK-4 Cytokinesis defect 4

D

DDK DBF4-dependent kinase

DP Dimerization partner

E

ES Embryonic stem

ETS-1 Erythroblastosis virus E26 homolog-1

F

FOXM1 Forkhead box protein M1

G

G₀ Gap 0

G₁ Gap 1

G₂ Gap 2

GSK3 Glycogen synthase kinase 3

GTP Guanosine Triphosphate

H

HEC1 Highly expressed in cancer protein1

HECT Homologous to the E6-AP carboxyl terminus

HERC HECT and RCC1-like domain

HPV-16 E6 Human papilloma virus-16 E6

I

IBR In between ring

IDR Intrinsically disordered region

INK4 Inhibitor of CDK4

IRF-3 Interferon regulatory factor-3

K

KIP Kinase inhibitory protein

KLHL20 Kelch-like protein 20

L

LRP Low-density lipoprotein receptor-related protein

M

MCC Mitotic checkpoint complex

MCL1 Myeloid leukemia cell differentiation protein 1

MCM Minichromosome maintenance complex

MDM2 Mouse double minute 2

MDMX Mouse double minute X

MED1 Mediator complex subunit 1

MKLP1 Mitotic kinesin-like protein 1

MPF Maturation-promoting factor

MPS1 Multipolar spindle 1

MRLC Myosin regulatory light chain

MTOC Microtubule Organizing Center

N

NEDD4 Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4

NPM Nucléophosmine

O

ORC Origin recognition complex

P

PCNA Proliferating cell nuclear antigen

PH Plekstrin homology

PLK1 Polo like kinase 1

Pol α ADN polymérase alpha

Pol ϵ ADN polymérase epsilon

PP1 Protéine phosphatase 1

PP2A Protéine phosphatase 2A

PRC Polycomb repressive complex

Pré-IC Complexe de pré-initiation

Pré-RC Complexe de pré-réplication

PRP19 Precursor RNA processing 19

PTF1a Pancreas transcription factor 1a

R

RB Rétinoblastome

RBR RING-between-RING

RFC Replication factor C

RLD Regulator of chromosome condensation 1 like domain

RPA Replication protein A

RIF1 Telomeric protein Rap1-interacting factor

RING Really interesting new gene

S

SAC Spindle assembly checkpoint

SCF-Fbw7 Skp cullin F-box/WD repeat-containing protein 7

SIAH2 Seven in absentia homolog

SMC Structural maintenance of chromosome

SMURF1 Smad ubiquitylation regulatory factor 1

STING Stimulator of interferon genes

SWI/SNF Switch mutants/Sucrose Non-fermenting

T

TBK1 TANK-binding kinase 1

TCR T-cell antigen receptor

TOPBP1 DNA Topoisomerase II binding protein 1

TRAF6 TNF receptor associated factor

TRIP12 Thyroid hormone receptor interacting protein 12

U

UBC Ubiquitin conjugating domain

UBD Ubiquitin binding domain

UBEAB Ubiquitin conjugation factor E4B

U-box UFD2-homology

UHFR1 Ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1

ULF Ubiquitin ligase for ARF

USP Ubiquitin specific protease

V

VHL Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor

Liste des figures

Figure 1 : Les complexes CDK-cyclines au cours du cycle cellulaire	15
Figure 2: Expression des cyclines au cours du cycle cellulaire	16
Figure 3: Alignement des séquences du cœur catalytique des CDKs	17
Figure 4 : Mécanismes moléculaires de la progression en phase G ₁	18
Figure 5 : Formation du complexe de pré-réplication	19
Figure 6 : Formation du complexe de pré-initiation.....	20
Figure 7: Formation du réplisome	21
Figure 8: Organisation nucléaire du contrôle temporel de la réplication.....	22
Figure 9: Mécanismes moléculaires, dépendant de la cycline A2, responsables de l'activation du complexe Cycline B1/CDK1 pour déclencher l'entrée en mitose	24
Figure 10: Les différentes étapes de la mitose	25
Figure 11 : Mécanismes de compaction d'un chromosome mitotique	25
Figure 12 : Les différents types de microtubules présents pendant la mitose	28
Figure 13: Les différents types d'attachements d'un microtubule au chromosome	29
Figure 14: Principe du point de contrôle du fuseau mitotique ou SAC	30
Figure 15: Activation du complexe APC/C et transition métaphase/anaphase	31
Figure 16 : Représentation schématique et par immunofluorescence d'un pont anaphasique et d'un chromosome retardataire	35
Figure 17 : Schéma des 3 catégories de noyaux interphasiques atypiques.....	37
Figure 18 : Cascade d'ubiquitination	39
Figure 19 : Les différents types d'ubiquitination	40
Figure 20 : Les trois familles d'E3 ubiquitine ligases	44
Figure 21 : Mécanismes responsables de la dérégulation de l'ubiquitination dans le cancer.....	46
Figure 22 : Exemples d'E3 ubiquitine ligases et des processus cellulaires dérégulés dans le cancer	48
Figure 23 : Localisation du gène Trip12 sur le chromosome 2	51
Figure 24 : Niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine TRIP12 dans les tissus humains.....	52
Figure 25 : Séquence protéique de la protéine TRIP12	53

Figure 26 : Les orthologues de la protéine TRIP12 humaine	54
Figure 27 : Modifications post-traductionnelles de la protéine TRIP12.....	55
Figure 28 : TRIP12 dans la voie d'activation de p53 dépendante d'ARF	57
Figure 29 : Modèle illustrant la relation BAF155-BAF57-TRIP12	62
Figure 30 : Modèle d'induction de la dégradation d'ASXL1 par TRIP12.....	64
Figure 31 : Fréquence d'altération du gène Trip12 dans les cancers	69
Figure 32 : Annotation des mutations de TRIP12 sur sa séquence protéique	69
Figure 33 : Localisation de TRIP12 au niveau des kinétochores en mitose.	121
Figure 34: Quantification de l'expérience de « monastrol washout »	122

Liste des tableaux

<u>Tableau 1 :</u> Types de liaison de l'ubiquitine et rôles physiologiques	43
<u>Tableau 2 :</u> Composés ciblant les E3 ubiquitine ligases	50
<u>Tableau 3 :</u> Mutations du gène Trip12 et pathologies associées	67
<u>Tableau 4 :</u> Mutations du gène Trip12 et cancers associés.....	68

INTRODUCTION

I. Le cycle cellulaire

I.1. Le déroulement du cycle cellulaire

Deux milliards d'années d'évolution ont généré une immense variété de vies eucaryotes, avec approximativement 8,7 millions d'espèces existantes. La croissance et la reproduction de tous ces organismes dépendent de la duplication et de la distribution fidèle des chromosomes dans les nouvelles cellules filles naissantes. Ce processus est appelé le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est divisé en deux grandes étapes communes à l'ensemble des organismes : l'interphase et la mitose. Chez les Eucaryotes, l'interphase est la phase la plus longue du cycle cellulaire qui sépare deux mitoses successives et qui permet à la cellule de préparer sa division cellulaire. C'est une étape de croissance jusqu'à l'incorporation de nucléotides pendant une phase qui a été baptisée S pour synthèse de l'ADN. Les phases précédant et suivant la phase S sont appelées Gap 1 et Gap 2 (G_1 et G_2). La mitose, facilement observable par microscopie, correspond à l'étape de division cellulaire pendant laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules filles.

La progression d'une cellule dans les différentes étapes du cycle cellulaire se fait en grande partie grâce à l'activité de kinases qui phosphorylent les protéines sur les résidus sérines ou thréonines. L'activité de ces kinases dépend d'autres protéines importantes du cycle cellulaire : les cyclines, d'où leur nom kinases dépendantes des cyclines ou CDK (*Cyclin Dependent Kinase*)¹.

I.2. Les kinases dépendantes des cyclines (CDKs)

L'activité des CDKs nécessite leur liaison à une cycline, sous-unité régulatrice, dont l'expression est finement régulée au cours du cycle cellulaire. Chez l'Homme, il existe plus de 20 CDKs et 25 cyclines. Cependant, trois CDKs interphasiques (CDK2, CDK4 et CDK6), une CDK mitotique (CDK1) et dix cyclines (de type A, B, D et E) sont directement impliquées dans la progression du cycle cellulaire².

Les autres CDKs jouent différents rôles dans la différenciation des neurones, l'épissage et la transcription³.

I.2.a Les complexes CDK-cyclines au cours du cycle cellulaire

Des complexes CDK-cyclines spécifiques sont responsables de la progression d'une cellule à travers les différentes phases du cycle cellulaire (**Figure 1**). Pendant la phase G_1 , les

signaux encourageant une cellule à entrer dans un cycle de division sont appelés signaux mitogènes. Les signaux mitogènes peuvent être des facteurs de croissance ou des protéines qui déclenchent des voies de transduction du signal dans le but d'activer les CDKs. Dans un premier temps, ces signaux activent l'expression des cyclines de type D (D1, D2 et D3), qui s'associent préférentiellement avec les kinases CDK4 et CDK6⁴. L'activité de ces complexes conduit à l'expression des cyclines de type E (E1 et E2), lesquelles se lient à la kinase CDK2. L'activité du complexe Cycline E/CDK2 est nécessaire à la transition entre la phase G₁ et la phase S⁵. La cycline A2 s'accumule au début de la réplication de l'ADN, pour disparaître en début de mitose. Elle active la kinase CDK2 pour permettre la progression en phase S mais aussi la kinase CDK1 pour assurer la transition entre les phases S, G₂ et la mitose⁶. La

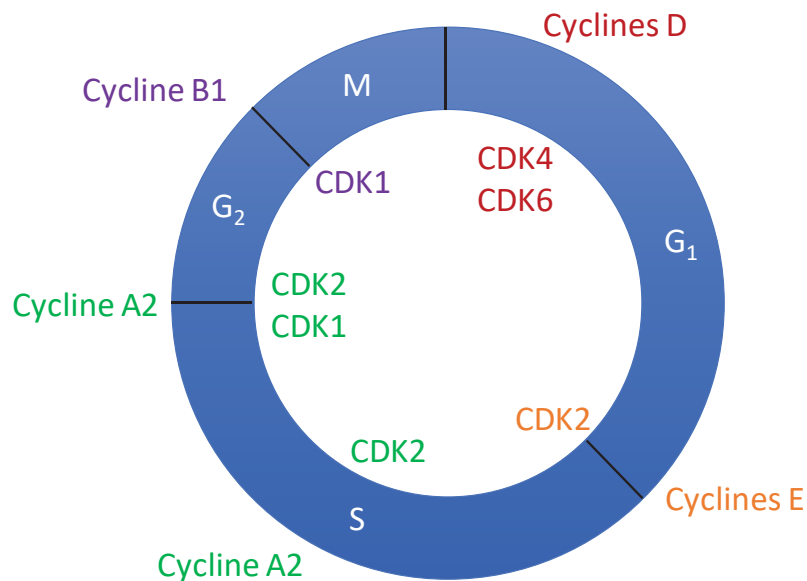


Figure 1 : Les complexes CDK-cyclines au cours du cycle cellulaire.

formation des complexes Cycline A2/CDK1-CDK2 facilite l'activation et la formation du complexe Cycline B1/CDK1 nécessaire pour l'entrée en mitose et la progression mitotique⁷.

I.2.b La régulation des complexes CDK-cyclines

La régulation de l'activité kinase des CDKs contrôle la vitesse de progression du cycle. Les CDKs ont un niveau d'expression relativement constant au cours du cycle cellulaire. Il existe différents niveaux de régulation qui contribuent à l'activité transitoire des CDKs : le niveau d'expression des cyclines qui permet la formation des complexes, le statut de phosphorylation des CDKs et la liaison à des inhibiteurs de CDKs.

1.2.b.1 Le niveau d'expression des cyclines

L'assemblage transitoire des complexes CDK-cyclines est limité à la durée de vie des cyclines. L'expression des cyclines au cours du cycle cellulaire correspond souvent à une synthèse lente ou rapide pour atteindre un pic d'expression et finit par une dégradation par le protéasome 26S (**Figure 2**).

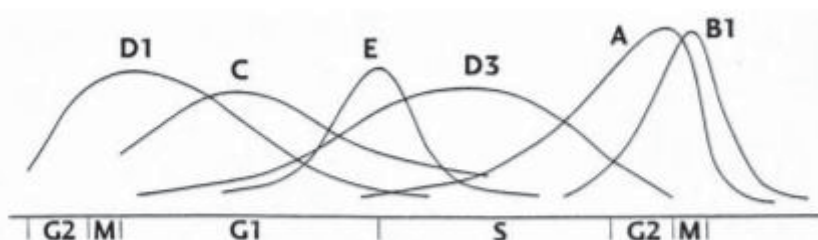


Figure 2: Expression des cyclines au cours du cycle cellulaire (de *Viallard et al. 2001*⁸).

Par exemple, le promoteur de la cycline A2 est réprimé pendant la phase G₁ et la transcription est activée par l'association du complexe Cycline E/CDK2 et du facteur de transcription E2F, au moment de l'entrée en phase S⁹. L'ARNm de la cycline A2 et celui de la cycline B1 s'accumulent pendant la réplication de l'ADN et diminuent en mitose¹⁰. En parallèle, les ARNm sont traduits en protéines pour permettre une accumulation des cyclines A2 et B1. Ces deux cyclines sont ensuite dégradées en mitose après polyubiquitination¹¹.

1.2.b.2 Le statut de phosphorylation des CDKs

Les kinases CDKs sont caractérisées par un cœur catalytique conservé composé d'une poche de liaison à l'ATP, d'un domaine de liaison aux cyclines (PSTAIRE-like) et d'un motif activateur (T-loop) (**Figure 3**). La liaison de la cycline est nécessaire à l'activation des kinases CDKs mais n'est pas suffisante³. Elle déplace le motif T-loop, ce qui expose la surface de liaison au substrat et réaligne les résidus du site actif, amorçant ainsi la phosphorylation. Le motif T-loop est alors accessible à l'action du complexe Cycline H/CDK7 (CAK : *CDK Activating Kinase*) qui le phosphoryle sur un résidu thréonine (T161 pour CDK1, T160 pour CDK2 et T172 pour CDK4)^{12,13,14}. Cette phosphorylation améliore l'interaction avec le substrat et stabilise le complexe CDK-cycline¹⁵. Pour être pleinement active, une CDK doit être déphosphorylée sur les résidus thréonine et tyrosine (T14 et Y15 pour CDK1) par les phosphatases de la famille des CDC25 (*Cell Division Cycle 25*)¹⁶. Par exemple, pour les kinases CDK1 et CDK2, ces phosphorylations inactivatrices sont catalysées dans leur poche catalytique par les kinases Myt1 et Wee1¹⁷.

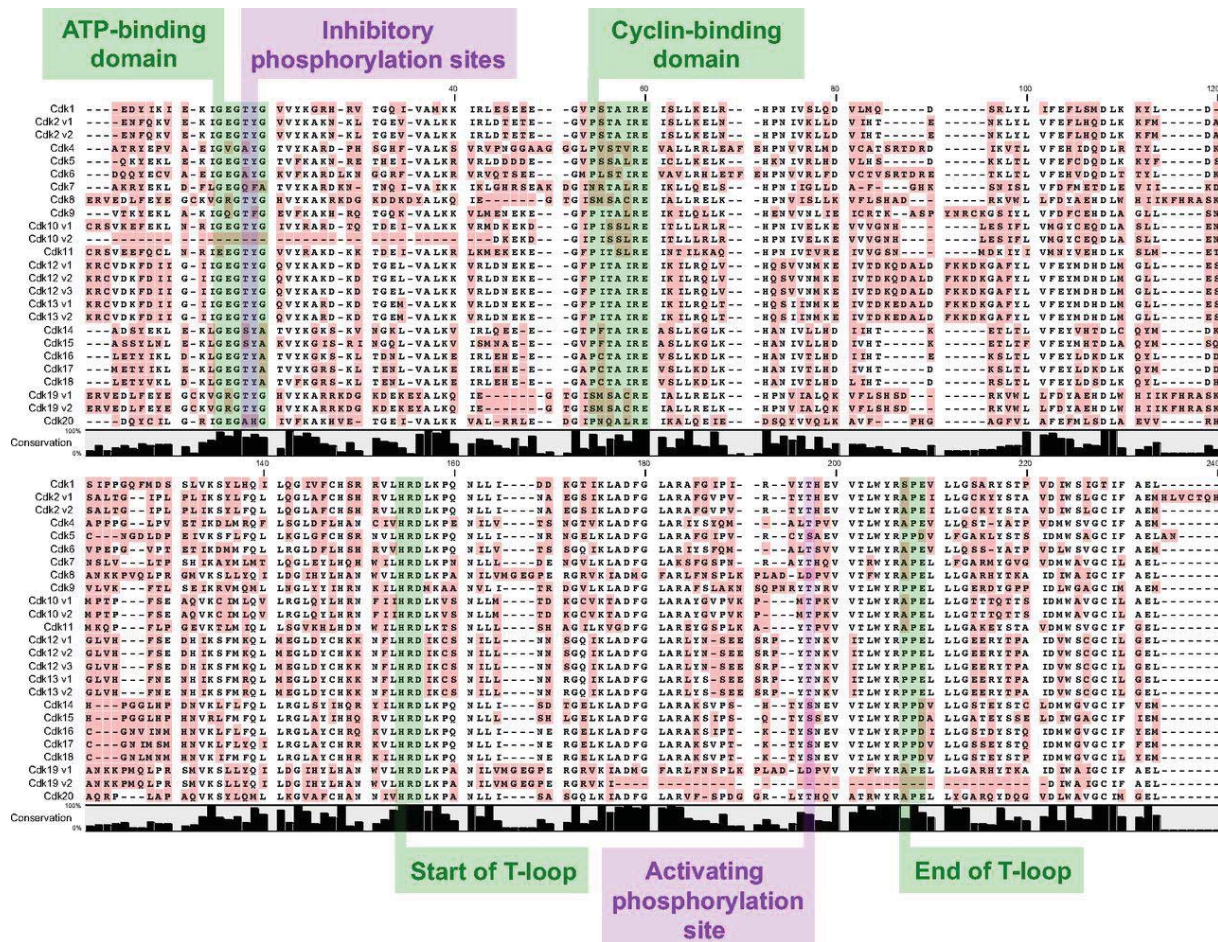


Figure 3: Alignement des séquences du cœur catalytique des CDKs (de Lim et al. 2013³). Les motifs importants sont surlignés en vert, notamment les domaines de liaisons à l'ATP, aux cyclines et les résidus délimitant le début et la fin du motif activateur T-loop. Les sites de phosphorylation sont surlignés en violet, notamment les résidus thréonines et tyrosines (T14 et Y15), dont les phosphorylations sont inhibitrices, situés dans la poche de liaison de l'ATP et le résidu thréonine activateur (T161), dont la phosphorylation est activatrice, du motif T-loop. Les résidus non conservés entre les CDKs sont surlignés en rose.

1.2.b.3 La liaison aux inhibiteurs des CDKs (CKI)

En plus de la régulation par des phosphorylations inhibitrices, d'autres protéines peuvent inhiber les kinases CDKs. Ces protéines nommées CKIs (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor*), interagissent avec la partie non catalytique des CDKs, induisant un changement conformationnel qui altère leur site de liaison aux cyclines et limite leur affinité pour l'ATP. Il existe deux familles de CKIs : les protéines CIP/KIP (*CDK-Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*) et INK4 (*Inhibitor of CDK4*)¹⁸.

La famille CIP/KIP est composée de 3 membres : p21 (WAF/CIP1), p27 (KIP1) et p57 (KIP2). Elles interviennent à toutes les étapes du cycle cellulaire pour stopper sa progression.

P21 inhibe le cycle cellulaire en interagissant avec CDK2 et CDK1 alors que p27 et p57 inhibent que CDK2³.

La famille de protéines INK4 est composée de 4 membres : p16 (INK4A), p15 (INK4B), p18 (INK4C) et p19 (INK4D). A la différence de la première famille qui peut intervenir tout au long du cycle cellulaire, les protéines INK4 jouent un rôle uniquement dans la régulation de la phase G₁, par l'inhibition de CDK4 et CDK6³.

I.3. Les étapes du cycle cellulaire

I.3.a La phase G₁

Lorsque les cellules ne se divisent pas, elles sont dites quiescentes (phase G₀). Sous l'effet de signaux mitogènes, une cellule sort de cette quiescence pour entrer en phase G₁, et ainsi entamer un cycle de division. La phase G₁ prépare la phase S. En effet, lors de cette étape, la cellule synthétise les protéines nécessaires pour proliférer et préparer la division cellulaire tout en contrôlant l'intégrité de son génome. Lorsque la cellule est de taille suffisante et que son ADN est sans altération, elle entre en phase S.

I.3.a.1 La progression en G₁

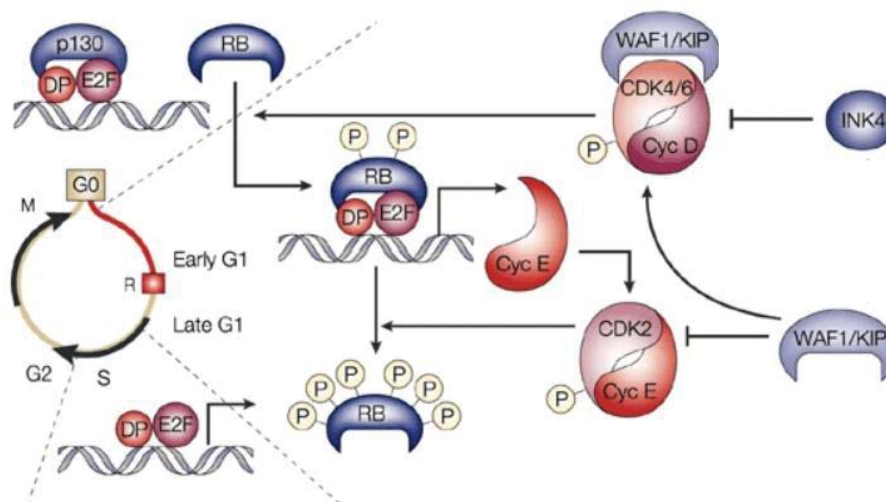


Figure 4 : Mécanismes moléculaires de la progression en phase G₁ (adaptée de *Malumbres et al. 2001*⁴).

Dans les cellules quiescentes en phase G₀, le facteur de transcription E2F-DBP est inhibé par la liaison avec p130. En phase G₁, le complexe RB-E2F-DBP est prédominant. Les signaux mitogènes provoquent la synthèse de la cycline D, la formation des complexes Cycline D/CDK4-6 et une phosphorylation initiale de la protéine RB. La protéine RB partiellement phosphorylée reste liée à E2F-DBP mais le facteur de transcription est capable d'activer la transcription de certains gènes dont la cycline E. L'induction de certains gènes permet l'inhibition de CDK4/6 par les CKIs de la famille INK4 et CIP/KIP et permet une pleine activation du complexe CDK2. Le complexe Cycline E/CDK2 nouvellement formé phosphoryle RB, provoquant son inactivation complète. L'inactivation de RB permet l'induction des gènes régulés par E2F qui sont nécessaires pour la transition G₁/S et pour initier la réplication.

La progression en phase G_1 est régulée par trois kinases CDKs (CDK4, CDK6 et CDK2) (**Figure 4**). Les premiers signaux mitogènes induisent la synthèse des cyclines de type D, provoquant la formation des complexes Cycline D/CDK4 et Cycline D/CDK6 et leur localisation dans le noyau⁴. Ces complexes alors actifs phosphorylent les protéines de la famille du Rétinoblastome (RB et p130) qui inhibent la transcription en interagissant avec les facteurs de transcription des membres de la famille E2F¹⁹. La phosphorylation de RB lève l'inhibition et provoque une activation partielle de E2F-DP (*Dimerization Partner*) qui active alors la transcription de facteurs importants pour la transition G_1/S dont les cyclines de type E. Par la suite, l'interaction des CKIs de la famille INK4 et CIP/KIP avec les complexes Cycline D/CDK4 et Cycline D/CDK6 permet l'activation du complexe Cycline E/CDK2²⁰.

Le complexe Cycline E/CDK2, une fois actif, provoque une inactivation complète de RB¹⁹. Cette étape, nommée point de restriction est le point de contrôle de la phase G_1 qui vérifie la bonne croissance cellulaire et s'assure du maintien de l'intégrité d'ADN. Si l'ADN présente des lésions le cycle cellulaire est alors arrêté par ce mécanisme de surveillance pour donner à la cellule le temps de réparer son ADN. La prolifération des cellules est ensuite enclenchée de manière irréversible indépendamment des signaux mitogènes.

1.3.a.2 La fin de G_1 : préparation de la transition G_1/S

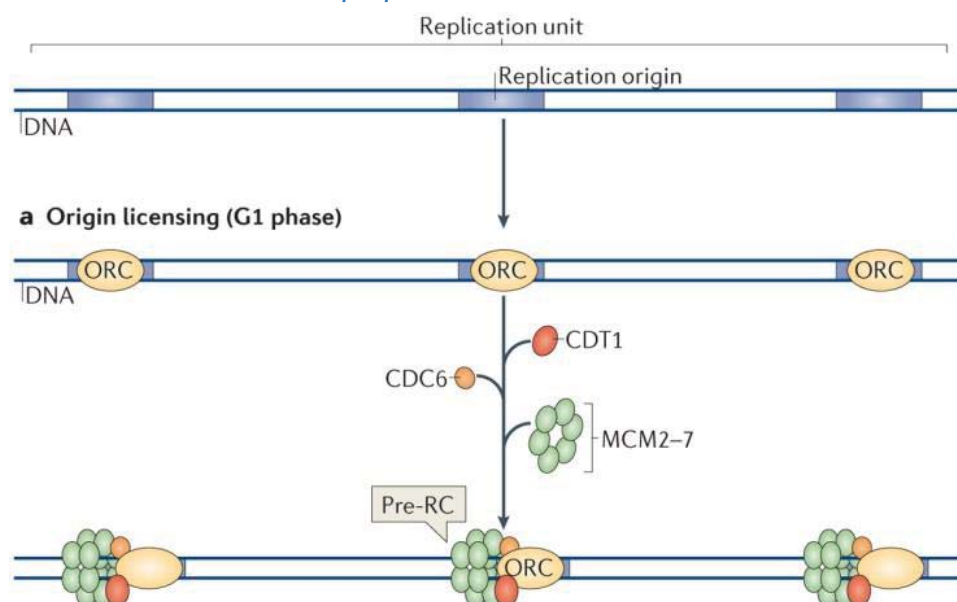


Figure 5 : Formation du complexe de pré-réplication (adaptée de *Fragkos et al. 2015*²¹).

Le facteur de transcription E2F étant pleinement activé peut continuer la transcription de gènes pour faciliter la transition G_1/S , tels que ceux de la cycline A2, mais aussi des hélicases MCMs (*Minichromosome Maintenance Complexe*) et l'ATPase cdc6 (*Cell Division Cycle 6*). Ensuite, l'assemblage du complexe de pré-réplication a lieu (pré-RC) (**Figure 5**). L'hexamère ORC (*Origin Recognition Complex*), composé de six sous-unités ORC1-6, se fixe

sur l'ADN au niveau de séquences particulières appelées origines de réplication (ORI). L'ORC permet le recrutement de cdc6 et du facteur de transcription Cdt1 (*Chromatin licensing and DNA replication factor 1*) qui servent de plateforme de recrutement pour le recrutement de deux complexes de six hélicases MCM2-7, qui sont côte à côte et inactifs dont le but sera de dérouler l'ADN. A cette étape, l'origine de réplication est initiée (« licensed ») et prête à être activée²².

1.3.a.3 La transition G₁/S

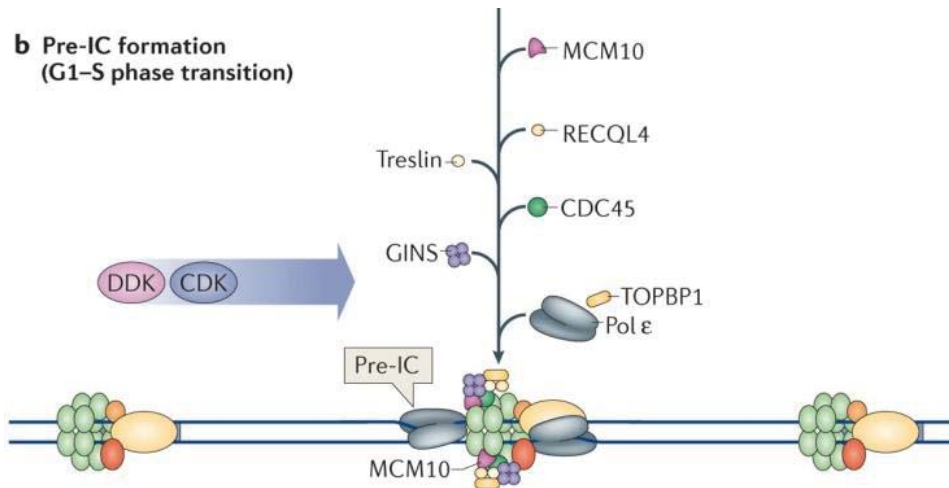


Figure 6 : Formation du complexe de pré-initiation (adaptée de Fragkos et al. 2015²¹).

Plusieurs protéines doivent s'associer au complexe de pré-réplication pour l'activer et ainsi former le complexe de pré-initiation (pré-IC) (**Figure 6**). L'activation du pré-RC nécessite une série de phosphorylation finement régulée par deux kinases, CDK2 et DDK (*DBF4-dependent kinase*). La liaison transitoire de DDK à la chromatine et le recrutement du complexe Cycline E/CDK2 permet de phosphoryler les MCMs et de dissocier les deux hexamères^{23,24}. Ces phosphorylations sont également essentielles pour permettre le recrutement et la formation du complexe CMG (CDC45, MCMs et le complexe GINS), composant du pré-IC. Le complexe CMG stimule l'activité hélicase des MCMs. Cependant, le complexe de pré-initiation nécessite d'autres facteurs avant de constituer une machinerie de réplication active. CDC45 permet le recrutement des ADN polymérases, notamment Pol α et Pol ϵ . Le complexe Cycline E/CDK2 est responsable du recrutement des derniers facteurs en les phosphorylant. Parmi ces facteurs, deux protéines sont essentielles dans la formation du complexe CMG : RecQL4 et MCM10²⁵. Enfin, la phosphorylation de la protéine Treslin favorise son interaction avec la topoisomérase TOPBP1 (*DNA Topoisomerase II Binding Protein 1*), une protéine essentielle pour l'activation du complexe CMG²⁶. Le pré-IC alors formé, l'origine de réplication est dite activée. La transition G₁/S est finalement amorcée lorsque la cycline E

est polyubiquitinée par l'E3 ubiquitine ligase SCF-Fbxw7 (*Skp Cullin F-box/WD repeat-containing protein 7*), induisant sa dégradation par le protéasome²⁷. Au cours de cette transition la duplication des centrosomes est initiée par la kinase Plk4²⁸.

I.3.b La phase S

Cette phase correspond à l'étape de synthèse de l'ADN au cours de laquelle les chromosomes et les centrosomes se dupliquent. La duplication des chromosomes est une étape importante pour le maintien de la stabilité génétique. En effet, chaque séquence nucléotidique doit être dupliquée avec une très grande précision afin que les deux cellules filles reçoivent la même information génétique.

I.3.b.1 La formation du réplisome

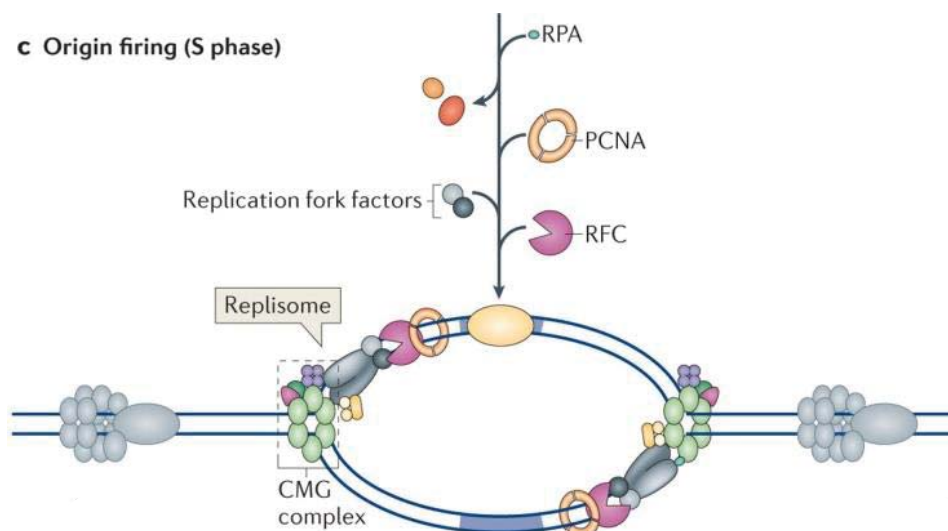


Figure 7: Formation du réplisome (adaptée de *Fragkos et al. 2015*²¹).

Une fois l'origine de réplication activée, le double hexamère MCM2-7 se divise en deux hexamères, qui vont jouer un rôle au niveau de deux fourches de réplication différentes (**Figure 7**). Ces complexes vont dérouler la double hélice d'ADN en brisant les liaisons hydrogènes entre les bases azotées. Ceci génère ainsi de l'ADN simple brin (ADNsb) recouvert par une protéine affine pour l'ADNsb, la protéine RPA (*Replication Protein A*). Le facteur RFC (*Replication Factor C*) est également recruté et permet aux polymérases réplicatives associées à leur facteur de processivité PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) d'accéder à la matrice d'ADN. Le réplisome ainsi formé, l'élongation par les ADN polymérases peut commencer au niveau des fourches de réplication. L'activité du complexe Cycline

A/CDK2 est nécessaire pour cette étape, puisqu'il active l'ADN polymérase δ^{29} . La réplication d'une portion de l'ADN se termine lorsque deux fourches de réplication se rencontrent, ce qui provoque la dissociation des réplisomes de la chromatine.

1.3.b.2 Le contrôle temporel de la réplication

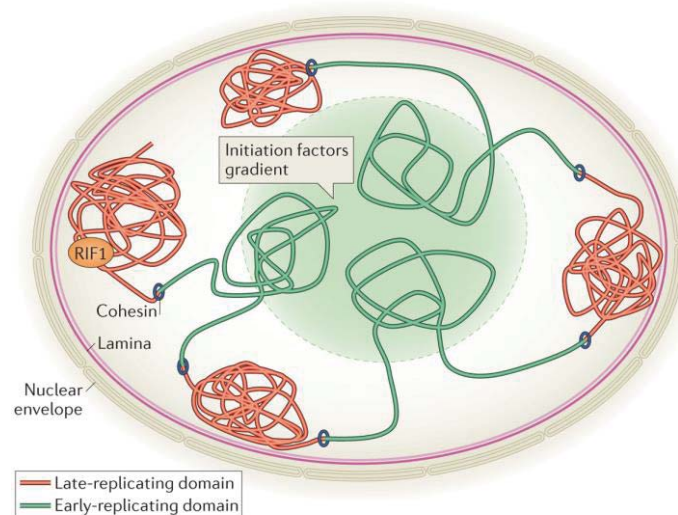


Figure 8 : Organisation nucléaire du contrôle temporel de la réplication (adaptée de *Fragkos et al. 2015*²¹).

Représentation d'un noyau avec les lamines (lignes roses) incorporées dans l'enveloppe nucléaire. Les origines de réplication qui doivent être répliquées en début de phase S sont associées aux régions riches en gènes transcriptionnellement actifs où la chromatine est ouverte (vert). A l'inverse, les origines de réplication qui doivent être répliquées en fin de phase S sont associées aux régions transcriptionnellement inactives où la chromatine est compactée. La réplication de l'ADN commence à l'intérieur du noyau. La liaison entre les régions de réplication précoces et tardives serait assurée par les cohésines. Le contrôle temporel de l'activation des origines dépend de la protéine RIF1 (*Telomeric Protein Rap1-interacting factor*).

Les origines de réplication ne sont pas activées toutes en même temps, elles suivent un programme temporel d'activation tout au long de la phase S, appelé programme temporel de la réplication. Ce programme est imposé par l'organisation et la structure des chromosomes dans le noyau, la régulation des programmes de transcription et la concentration limitante des facteurs de réplication. Le génome est segmenté en domaines, localisés au niveau de régions distinctes du noyau, dans lesquels l'ADN est répliqué pendant la phase S³⁰. La réplication débute au niveau de domaines de réplication précis à l'intérieur du noyau, représentés en vert **Figure 8**. Ce sont des régions riches en gènes transcriptionnellement actifs associées à des marques épigénétiques de chromatine ouverte. Elles sont également enrichies en origines de réplication et en complexe ORC³¹. La réplication se termine au niveau des domaines de réplication tardifs souvent proches des domaines associés aux lamines à la périphérie du noyau, représentés en rouge **Figure 8**. Ce sont des régions chromosomiques pauvres en origines de réplication, avec une densité faible de gènes et enrichies en hétérochromatine³².

Le contrôle temporel de l'activation des origines est régulé par plusieurs protéines, notamment par RIF1 (*Telomeric Protein Rap1-interacting factor*). Au début de la phase S, cette protéine retarde l'activation des origines tardives en les séquestrant dans des régions nucléaires inaccessibles aux facteurs activateurs³³.

Le contrôle temporel de la réplication est important puisque la réplication de l'ADN doit être complète et la re-réplication doit être évitée. De ce fait, le complexe Cycline A2/CDK2 est essentiel pendant toute la phase S. Il empêche une 2^{ème} réplication, en phosphorylant notamment la protéine Cdc6, provoquant son détachement de l'ADN, ce qui évite la constitution d'un nouveau complexe d'initiation au même endroit du génome³⁴.

I.3.c La phase G₂

Après la réplication de l'ADN, la cellule entre en phase G₂ pour préparer la division mitotique. Au cours de cette phase, le cycle du centrosome continue. Font suite à la duplication, la disjonction puis la maturation des centrosomes qui sont régulées par les kinases Aurora A et Plk1³⁵. Une augmentation de la taille des centrosomes est observée après recrutement de la γ -tubuline. Le point de surveillance de la fin de phase G₂ sera activé si la réplication ne s'est pas effectuée correctement et/ou si l'ADN est endommagé. Lorsque tout est contrôlé et réparé, la cellule entre en mitose.

I.3.c.1 Les rôles de la cycline A2 dans l'activation du complexe Cycline B1/CDK1

Les complexes Cycline A2/CDK1-2 et Cycline B1/CDK1 sont majoritaires en phase G₂. Ce dernier est également appelé MPF (*Maturation-Promoting Factor*) et est primordial dans le déclenchement de l'entrée en mitose.

Le niveau d'expression des cyclines mitotiques varie avec le cycle cellulaire. Elles s'accumulent progressivement pendant l'interphase et disparaissent abruptement au cours de la mitose. La cycline A2 est synthétisée dès le début de la phase S, juste avant la cycline B1, pour atteindre un maximum d'expression en fin de phase G₂¹⁰. Au cours de la phase S, le complexe Cycline A2/CDK2 assure indirectement la transcription de la cycline B1 en phosphorylant le facteur de transcription FoxM1 (*Forkhead box protein M1*), également responsable de la transcription du gène *Plk1* (*Polo Like Kinase 1*) (**Figure 9**)³⁶. Pour que le pic d'expression de la cycline B1 soit atteint en fin de phase G₂, le complexe Cycline A2/CDK2 inhibe sa protéolyse en phosphorylant Cdh1, co-activateur de l'E3 ubiquitine ligase APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) (**Figure 9**)³⁷.

En milieu de phase G₂, le complexe Cycline B1/CDK1 est inactivé par des phosphorylations inhibitrices catalysées par les kinases Wee1 et Myt1 sur les résidus Y15 et T14 (**Figure 9**)³⁸. Le complexe Cycline A2/CDK2 inactive Wee1 en induisant son export nucléaire et lève ainsi le mécanisme de répression sur le complexe Cycline B1/CDK1 (**Figure 9**)³⁹. L'activation complète du complexe Cycline B1/CDK1 intervient à la fin de la phase G₂ et le complexe Cycline A2/CDK2 y joue un rôle primordial. En effet, il phosphoryle la protéine Bora sur le résidu S110, laquelle stimule la phosphorylation de la kinase PLK1 sur le résidu T210 par la kinase Aurora A⁴⁰. PLK1, alors activée, induit la phosphorylation inhibitrice de la kinase Myt1 et la phosphorylation activatrice de la phosphatase CDC25C (**Figure 9**). Cette dernière est responsable de l'activation de la kinase CDK1 en enlevant les deux phosphorylations inhibitrices (T14 et Y15).

Enfin, le complexe CyclineB1/CDK1 actif phosphoryle en retour la phosphatase CDC25C. La mise en place de cette boucle d'autorégulation positive permet l'activation rapide et massive du complexe Cycline B1/CDK1 et ainsi le déclenchement de l'entrée en mitose (**Figure 9**).

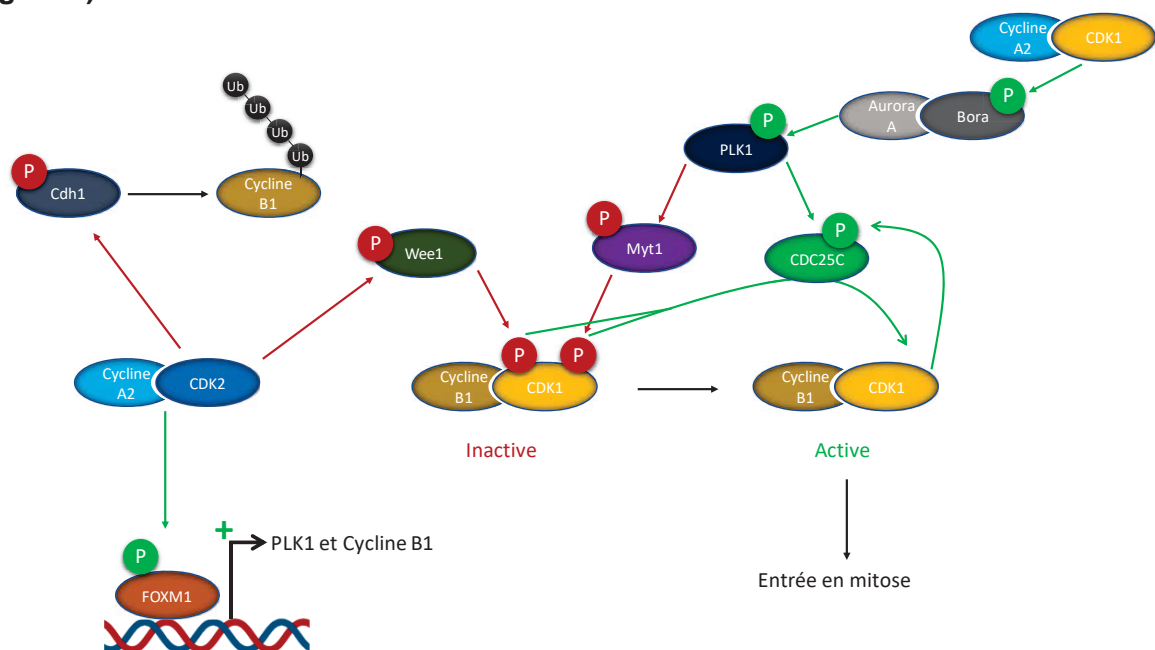


Figure 9: Mécanismes moléculaires dépendant de la cycline A2 responsables de l'activation du complexe Cycline B1/CDK1 pour déclencher l'entrée en mitose.

I.3.d La mitose

Le complexe Cycline B1/CDK1 induit l'entrée en mitose. La phosphorylation d'un grand nombre de substrats par ce complexe permet la condensation de l'ADN, la déstructuration de l'enveloppe nucléaire, la fragmentation de l'appareil de Golgi et la réorganisation du cytosquelette par la mise en place du fuseau mitotique.

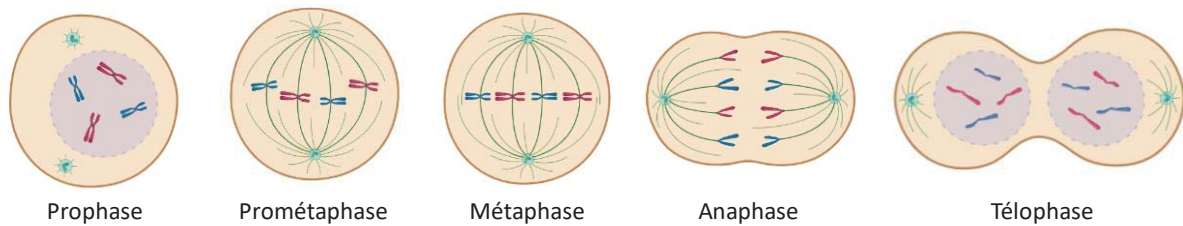


Figure 10: Les différentes étapes de la mitose.

La mitose est l'étape ultime du cycle cellulaire. Elle est composée de cinq phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (**Figure 10**). Le but de la division cellulaire est la répartition équitable du matériel génétique entre deux cellules filles⁴¹.

1.3.d.1 La prophase

1.3.d.1.a Les changements dans le noyau

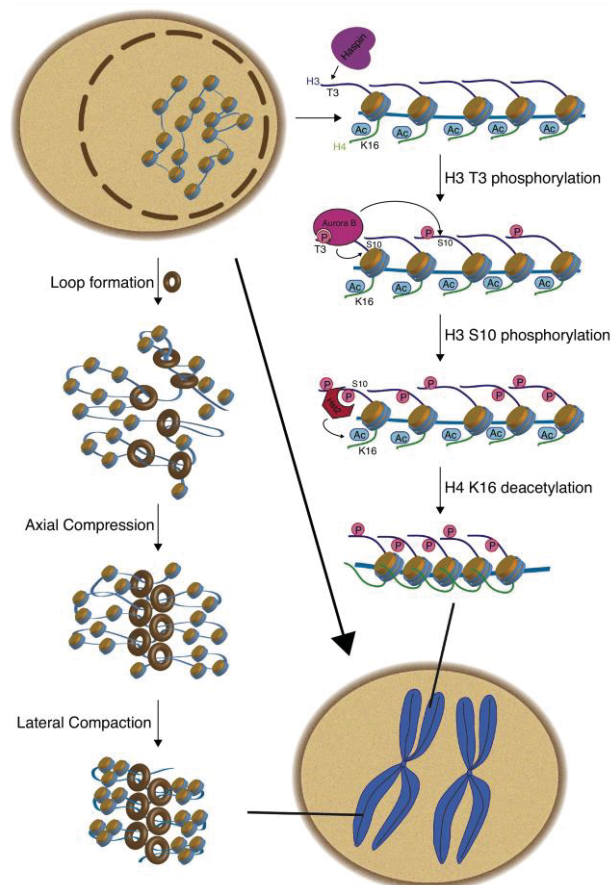


Figure 11 : Mécanismes de compaction d'un chromosome mitotique (de Antonin et al. 2016⁴²).

La formation de boucle de chromatine linéaire par les condensines (SMC2 et SMC4) est l'évènement initiateur de la compaction. Plus tard au cours de la mitose, les condensines s'associent à la Topoisomérase II pour compacter la chromatine de manière axiale et latérale. En parallèle, des modifications post-traductionnelles affectent la compaction des chromosomes. Les phosphorylations de l'Histone H3 sur T3 et S10 par les kinases Haspin et Aurora B, permettent le recrutement de la désacétylase Hst2p. Elle désacétyle la lysine 16 de l'Histone H4 qui permet l'interaction entre les nucléosomes et donc la compaction de la chromatine.

L'apparition de chromosomes condensés définit le début de la prophase. La compaction diminue la longueur et augmente l'épaisseur de chaque chromosome. Au cours de cette compaction, la transcription est ralentie, voire arrêtée. Les mécanismes impliqués dans la compaction sont débattus depuis des années en raison des connaissances limitées sur la structure des chromosomes. Des études montrent que les condensines, une famille de protéines non histones, sont capables d'encercler une ou plusieurs parties de l'ADN double brin et d'affecter son repliement (**Figure 11**)^{43,44}. La condensation pilotée par les condensines forme une boucle qui compacte la chromatine de manière axiale et latérale. Des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation et la désacétylation des histones, sont également impliquées dans la condensation de la chromatine (**Figure 11**)⁴². La condensation pilotée par les modifications d'histones permet une compaction locale de la chromatine entre les nucléosomes. Cependant, les données disponibles à ce jour ne sont pas suffisantes pour comprendre comment la structure des chromosomes change au cours de la compaction.

Pendant la condensation de la chromatine, plusieurs événements additionnels aident la cellule à préparer sa division. Les nucléoles se dissipent et la disparition de l'enveloppe nucléaire débute par la phosphorylation des nucléoporines et des lamines par le complexe Cycline B1/CDK1. La disparition du réseau de lamines fragilise l'enveloppe nucléaire car ces protéines sont des composants de la surface interne de l'enveloppe nucléaire. La rupture de l'enveloppe est un événement très contrôlé. Les microtubules du fuseau mitotique naissant poussent sur la face interne de la membrane fragilisée⁴⁵. Enfin, pendant sa rupture l'enveloppe nucléaire forme des vésicules et des citernes qui fusionnent avec le réticulum endoplasmique⁴⁶.

I.3.d.1.b Les changements dans le cytoplasme

La synthèse protéique diminue pendant la prophase. En effet, les ribosomes transitent plus lentement sur les ARN messagers et provoque une accumulation de polysomes. Ce mécanisme est très peu connu mais pourrait protéger les ARNm pendant la mitose et permettre de recommencer plus rapidement la synthèse protéique après la division cellulaire⁴⁷. La disparition des microtubules interphasiques est suivie par la formation de nouveaux microtubules mitotiques à partir des centrosomes. Les centrosomes, considérés comme des organites, sont localisés dans le cytoplasme et sont au nombre de deux. Certains types cellulaires ne possèdent pas de centrosome, notamment les levures, les ovocytes et les cellules végétales. Le centrosome est un centre organisateur des microtubules (MTOC) composé de deux centrioles desquels émergent les microtubules à l'origine de la formation du fuseau mitotique. Les deux centrosomes d'une cellule sont proches lors de l'initiation de la croissance des microtubules et se séparent quand le fuseau prend forme. Ces microtubules

sont plus dynamiques que ceux présents en interphase. Ceci est dû à la phosphorylation de facteurs associés aux microtubules par la kinase Aurora A, comme les protéines à domaine « tog » qui catalysent la polymérisation de la tubuline et à la stathmine, une petite protéine qui se fixe sur la tubuline et bloque l'assemblage du microtubule^{48,49}. Les filaments intermédiaires de vimentine disparaissent aussi pendant la prophase suite à leur phosphorylation par le complexe Cycline B1/CDK1⁵⁰. A l'inverse, les cytokératines persistent mais s'effondrent sur le noyau et forment une cage qui encercle le nucléoplasme même après la rupture de l'enveloppe nucléaire⁵¹.

I.3.d.1.c L'importance de la restructuration pendant la prophase

Les changements mitotiques dans l'organisation du cytosquelette sont significatifs et importants pour la suite de la mitose. En effet, la plupart des protéines qui fabriquent le fuseau mitotique sont les protéines qui construisent le cytosquelette interphasique (Tubuline α et β). Dans une cellule animale, la disparition de ce cytosquelette provoque un arrondissement de la cellule lui donnant une symétrie qui favorise une distribution uniforme de son contenu et la répartition équitable des organelles pendant la cytodierèse. Enfin, une cellule arrondie facilite l'orientation du fuseau et permet de réaliser correctement la division⁵².

Pendant la prophase, l'appareil de Golgi est fragmenté en plusieurs vésicules et tubules⁵³. Au moment de la métaphase, ces structures sont réparties uniformément à travers le cytoplasme⁵⁴. Le réticulum endoplasmique est traité différemment, il se déplace à la périphérie de la cellule en se positionnant juste en dessous de la membrane plasmique⁵⁵. Le mécanisme expliquant ce repositionnement n'est pas connu. Néanmoins, il accomplit le même but, une répartition égale des organelles lors de la division cellulaire. La fin de la prophase est associée à la rupture de la membrane nucléaire.

I.3.d.2 La prométaphase

I.3.d.2.a La mise en place du fuseau mitotique et l'attachement des chromosomes

Une fois les centrosomes localisés aux deux pôles de la cellule, l'organisation des microtubules et la mise en place du fuseau mitotique peuvent commencer. Les microtubules sont polarisés grâce aux dimères de tubuline α et β qui les composent. Les extrémités négatives des microtubules composées d' α tubuline sont stabilisées au niveau des centrosomes par la protéine NuMa⁵⁶. Il existe trois types de microtubules : les microtubules astraux participant au bon positionnement du fuseau, les microtubules interpolaire qui parcourent le long de la cellule pour interagir ensemble au niveau de leurs extrémités positives

β tubuline pour relier les deux pôles de la cellule et enfin les microtubules kinétochoriens qui participent à la capture des chromosomes (**Figure 12**)⁵⁷.

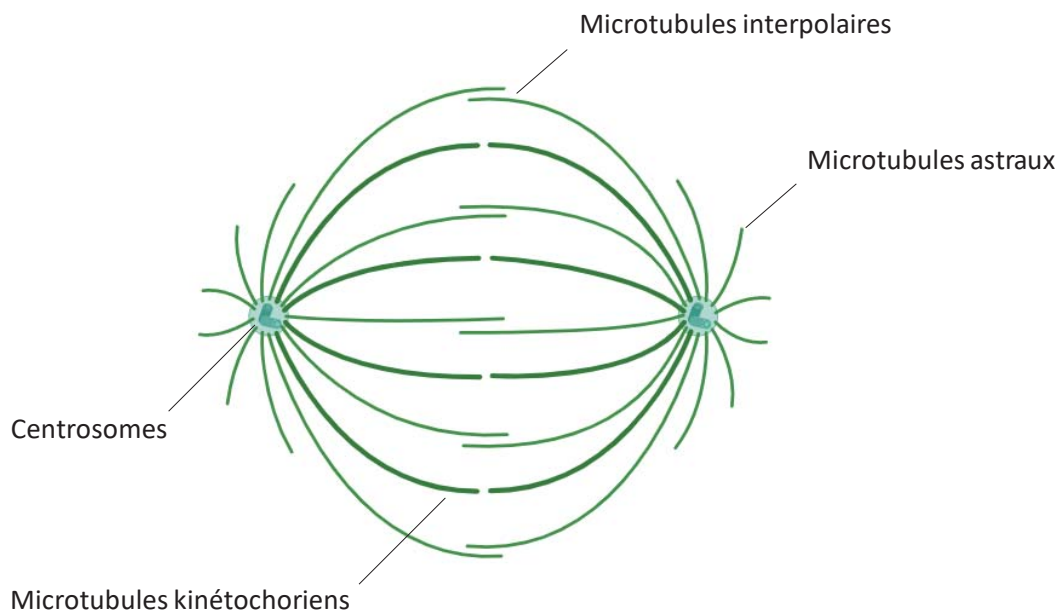


Figure 12 : Les différents types de microtubules présents pendant la mitose.

L'attachement des chromosomes sur le fuseau se fait *via* des structures chromosomiques appelées kinétochores. Il existe un kinétochore par chromatide. Il est composé de plusieurs protéines se localisant au niveau des centromères. Dans les cellules humaines, environ 100 protéines constituent ces structures pour former de multiples complexes protéiques⁵⁸. Deux modèles complémentaires illustrent la capture des chromosomes par les microtubules kinétochoriens. Les microtubules peuvent se polymériser à partir des kinétochores libres et s'orienter jusqu'au pôle grâce à la protéine NuMa localisée au niveau des extrémités libres. L'interaction de NuMa avec le moteur moléculaire dynéine permet sa migration le long des microtubules jusqu'à leurs extrémités négatives localisées au niveau du centrosome⁵⁹. Cette polymérisation s'effectue également à partir des centrosomes et entraîne une interaction entre les extrémités positives des microtubules et les kinétochores⁶⁰.

Les objectifs majeurs de la capture des chromosomes par le fuseau mitotique sont d'attacher tous les chromosomes et de s'assurer que l'attachement des chromosomes aux microtubules soient corrects^{61,62}. Pour qu'un attachement soit correct, il faut que le kinétochore de chaque chromatides sœurs d'un même chromosome soit attaché et mis sous tension par des microtubules issus de centrosome opposé. Un attachement correct au fuseau mitotique est une conformation amphotélique, définie par la liaison de chaque kinétochore sœur à un

microtubule issu des deux pôles (**Figure 13**). Il existe trois types d'erreurs d'attachement : ils peuvent être monotéliques, syntéliques et/ou mérotéliques. Une conformation monotélique se définit par la liaison d'un seul kinétochore à un microtubule. Cette conformation se produit de manière transitoire au moment de la formation du fuseau mais la plupart des chromosomes atteignent une conformation amphitélique à la fin de la prométaphase. L'attachement est dit syntélique lorsque les deux kinétochores sœurs sont attachés à des microtubules d'un seul pôle (**Figure 13**). Enfin, l'attachement mérotélique correspond à la situation où le même kinétochore est attaché à deux microtubules émanant des deux pôles (**Figure 13**)⁶³.

Les différents problèmes lors d'attachement des chromosomes au fuseau mitotique peuvent provoquer des erreurs de ségrégations chromosomiques lors de l'anaphase. Ce nombre d'erreur en mitose est réduit en partie par des mécanismes de correction qui peuvent intervenir avant ou après l'initiation de l'anaphase^{64,65,66}. De plus, les kinétochores possèdent des protéines kinases, telle que MPS1 (*Multipolar Spindle 1*) dont l'activité contrôle la localisation de protéines additionnelles composant ces structures en réponse à un mauvais attachement à un microtubule⁶⁷. Ces kinases font partie du point de contrôle du fuseau mitotique qui arrête le cycle cellulaire en prométaphase jusqu'à ce que tous les chromosomes soient correctement attachés au fuseau mitotique^{68,69}.

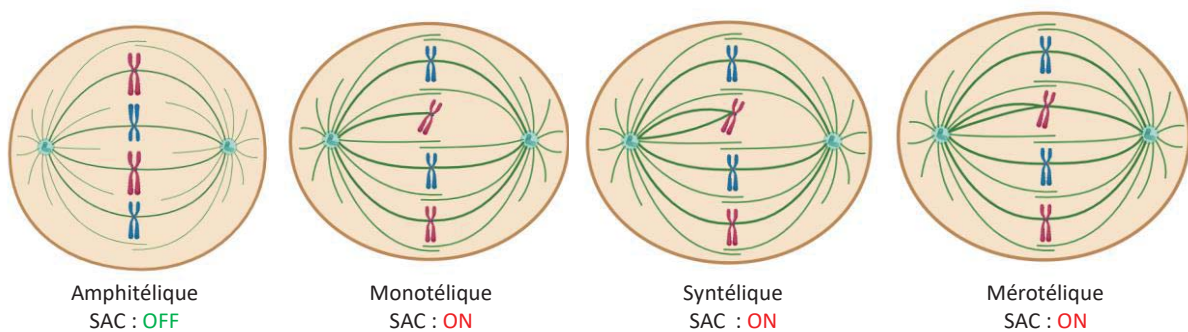


Figure 13: Les différents types d'attachements d'un microtubule au chromosome.

1.3.d.2.b Le point de contrôle du fuseau mitotique

Le point de contrôle du fuseau mitotique ou SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) est activé par défaut dès l'entrée des cellules en mitose. Il empêche la transition métaphase anaphase tant que tous les kinétochores ne sont pas correctement attachés au fuseau mitotique (**Figure 13**) afin d'éviter une ségrégation précoce des chromosomes. Dans ce but, il inhibe APC/C, un complexe nécessaire à l'avancée en mitose jusqu'à ce que le dernier kinétochore soit attaché au fuseau⁷⁰. Une fois le SAC satisfait, la cellule peut passer en anaphase. Bien que les mécanismes de ce point de contrôle ne soient pas complètement élucidés, les principales étapes clés sont connues. Un kinétochore libre recrute plusieurs protéines identifiées pour la toute première fois lors d'un crible chez la Levure (**Figure 14**)^{71,72}.

Ce sont les protéines Mad, Bub (*Budding Uninhibited by Benzimidazole*) et MPS1. Le recrutement de Mad1, Mad2 et Bub1 au niveau du kinétochore catalyse l'assemblage d'un complexe : le MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*) dont le but est d'inhiber APC/C en facilitant la liaison entre Mad2 et Cdc20, un coactivateur de APC/C^{73,74}. Le MCC est composé des protéines Mad2, Bub1 et Bub3 qui inactivent Cdc20⁷⁵. En effet, Mad2 interagit avec Cdc20 au niveau du motif de liaison avec APC/C, empêchant ainsi l'interaction de Cdc20 avec APC/C⁷⁶. Le SAC est inhibé lorsque le dernier kinétochore est correctement attaché et correspond à la métaphase. Les mécanismes de l'inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique et de l'activation simultanée d'APC/C ne sont pas encore connus.

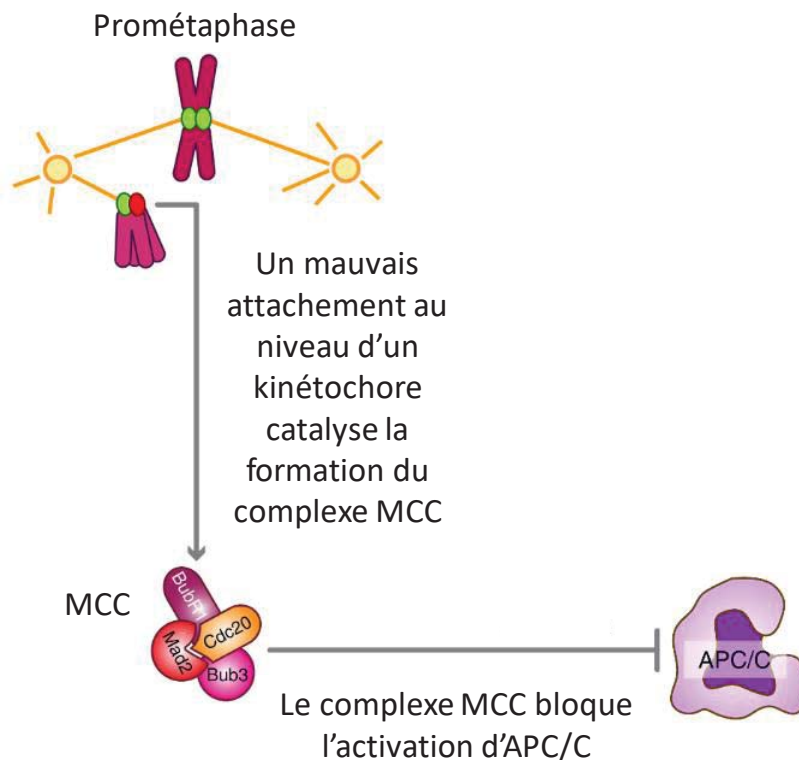


Figure 14: Principe du point de contrôle du fuseau mitotique ou SAC (adaptée de *Pablo Lara-Gonzalez et al. 2012*⁷⁷).

1.3.d.3 La métaphase

1.3.d.3.a Le complexe APC/C

La régulation de l'activation du complexe APC/C, possédant une activité E3 ubiquitine ligase, est directement liée à son interaction avec deux protéines co-activatrices : cdc20 et Cdh1. Cdc20 active APC/C lors de la transition métaphase/anaphase. Cdh1 s'associe avec APC/C en fin de mitose et pendant la phase G₁. Ces deux co-activateurs fonctionnent comme des adaptateurs pour recruter les substrats d'APC/C grâce à leur capacité à reconnaître deux

degrons fortement conservés et présents dans la plupart des substrats d'APC/C : les destruction box (D-box)⁷⁸ et les KEN box⁷⁹. Une inactivation du SAC est observée dès que les chromosomes sont parfaitement alignés sur la plaque équatoriale et correctement attachés au fuseau mitotique, levant ainsi son inhibition d'APC/C. Le complexe APC/C-Cdc20, alors actif, provoque l'ubiquitination et par conséquent la dégradation par le protéasome 26S de la sécurine, une protéine inhibitrice de la séparase (**Figure 15**). La séparase est une enzyme qui dégrade les cohésines et entraîne une séparation des chromatides sœurs⁸⁰. APC/C-Cdc20 dégrade également la Cycline B1 et provoque l'inactivation du complexe Cycline B1/CDK1⁸¹. L'inhibition de CDK1 conduit à l'activation de Cdh1, l'autre co-activateur d'APC/C qui était jusqu'alors inhibé par une phosphorylation dépendante de CDK1. APC/C-Cdh1 est responsable de la sortie de mitose en dégradant de nombreuses protéines mitotiques (Cdc20, Cyclines A2 et B1, PLK1, etc...)¹.

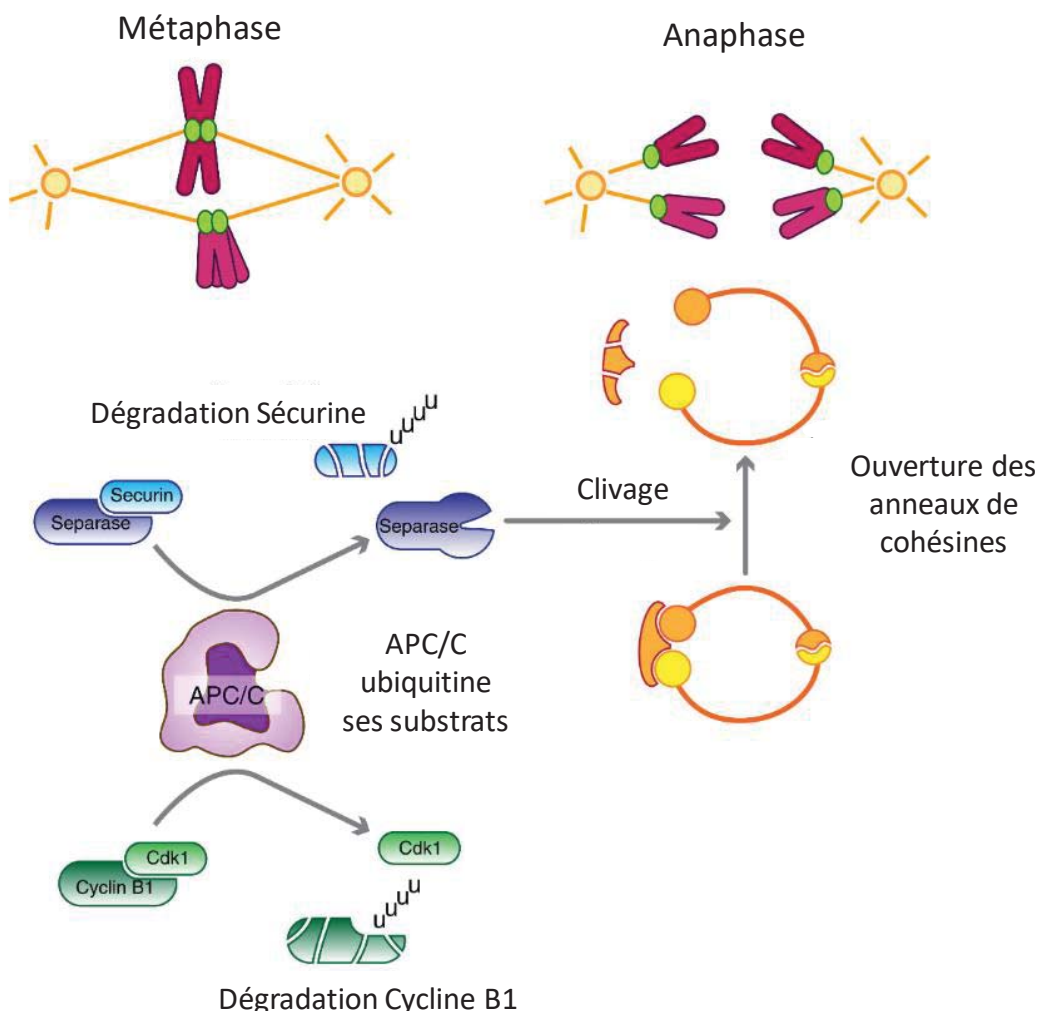


Figure 15: Activation du complexe APC/C et transition métaphase/anaphase (adaptée de *Pablo Lara-Gonzalez et al. 2012*⁷⁷).

1.3.d.4 L'anaphase

La séparation des chromatides sœurs est effectuée pendant l'anaphase. Celle-ci est subdivisée en anaphase A et anaphase B.

L'anaphase A correspond à la migration des chromatides sœurs vers les deux pôles de la cellule. Cette étape commence par le raccourcissement des microtubules kinétochoriens suite à la dépolymérisation de la tubuline au niveau des kinétochores⁸². Cette dépolymérisation se fait grâce à l'activité dépolymérase des moteurs moléculaires de la famille des kinésines⁸³. L'anaphase B correspond à une augmentation de la séparation des deux pôles de la cellule. Cette étape commence par la polymérisation des microtubules interpolaire qui permet une élongation du fuseau mitotique. La kinésine 5 interagit entre deux microtubules interpolaire et permet d'éloigner les deux pôles du fuseau en migrant vers les extrémités positives des microtubules⁸⁴. Les deux pôles continuent de s'éloigner l'un de l'autre grâce à l'action combinée de NuMa et de la dynéine. En effet, au cours de l'anaphase, NuMa se localise au niveau du cortex cellulaire et interagit avec la dynéine localisée sur les microtubules astraux, permettant son ancrage au cortex cellulaire. L'activité moteur de la dynéine entraîne son déplacement vers les extrémités négatives des microtubules, donc vers les pôles de la cellule et génère ainsi des forces de traction poussant les pôles vers la membrane plasmique⁸⁵. Les chromatides sœurs, définitivement séparées, restent séquestrées près des pôles grâce à l'association des kinétochores avec les centrosomes *via* différents complexes protéiques⁸⁶.

1.3.d.5 La télophase

La télophase est la dernière étape de la mitose caractérisée par la reformation de l'enveloppe nucléaire des deux cellules filles, la décondensation des chromosomes et le début de la cytotélorèse. Pour une réalisation efficace de ces différentes étapes, la dégradation complète de la Cycline B1 par le complexe APC/C-Cdh1 et par conséquent une inactivation de CDK1 sont nécessaires⁸⁷.

1.3.d.5.a La reformation de l'enveloppe nucléaire

Dans chaque future cellule fille, le réassemblage de l'enveloppe nucléaire doit assurer l'englobement total des chromosomes dans un seul noyau. C'est pour cela que la formation de l'enveloppe nucléaire débute autour des chromosomes avec la relocalisation des lamines B dont la déphosphorylation par la protéine phosphatase 1 (PP1) initie l'assemblage des lamines nucléaires⁸⁸. Ensuite, les membranes du réticulum endoplasmique contenant le récepteur aux lamines B s'associent autour de la chromatine. Enfin, la membrane nucléaire est définitivement fermée après deux dernières étapes : la fusion de l'enveloppe nucléaire en

cours de reformation avec les autres membranes cellulaires (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) et l'assemblage des pores nucléaires⁸⁹.

I.3.d.5.b La décondensation des chromosomes et la cytodiérèse

La protéine kinase Aurora B joue un rôle important dans la décondensation des chromosomes et la cytodiérèse en générant un gradient cytoplasmique de phosphorylation. Elle se localise au centre de la cellule et maintient la condensation des chromosomes uniquement dans cette région, *via* la phosphorylation des condensines et de l'histone H3 sur la sérine 10. Les chromosomes sortent de ce gradient lors de leur migration en fin d'anaphase et les phosphatases PP1 et PP2A antagonisent l'action d'Aurora B entraînant ainsi la décondensation des chromosomes.

Après la décondensation des chromosomes, un anneau contractile d'actine et de myosine est formé autour de la zone médiane et dont la contraction dépend de l'hydrolyse du GTP. L'anneau d'actomyosine est créé dans cette région de la cellule grâce à l'activité kinase d'Aurora B qui permet le recrutement du complexe protéique Centralspindlin, composé du moteur moléculaire MKLP1 (*Mitotic Kinesin-like Protein 1*) et de la Rho GTPase CYK-4 (*Cytokinesis defect 4*)⁹⁰. L'inactivation de CDK1 est indispensable au déclenchement de la cytodiérèse car la kinase CDK1 inhibe la myosine en phosphorylant sa chaîne légère MRLC (*Myosin Regulatory Light Chain*).

Des années de recherche dans une multitude de modèles et de systèmes ont révélé le cœur de la biochimie de la mitose. Cependant, un nombre important de questions reste encore en suspens. La progression en mitose dépend de la protéolyse de différentes protéines par APC/C, ce complexe étant lui-même sous la surveillance du point de contrôle du fuseau mitotique. Nos connaissances sur le fonctionnement d'APC/C sont avancées mais la manière dont il reconnaît la bonne protéine au bon moment reste encore floue. Il en est de même pour les mécanismes qui permettent la génération du MCC en réponse aux kinétochores non attachés ou correctement attachés. De plus, l'intervalle de temps entre l'activation d'APC/C et l'inhibition du SAC par le désassemblage du MCC, reste encore à être clarifié.

I.4 Les erreurs de ségrégation des chromosomes

Une mauvaise ségrégation des chromosomes pendant la mitose favorise l'instabilité génétique dans la cellule et par conséquent le développement du cancer. Deux grandes catégories de défauts sont responsables de la mauvaise répartition de l'information génétique entre deux cellules filles : les défauts de symétrie du fuseau mitotique et les défauts de ségrégation des chromatides sœurs.

Pour rappel, pour assurer une bonne ségrégation des chromatides sœurs dans deux cellules filles, il est indispensable que l'attachement entre les kinétochores et les microtubules soit correct. Les erreurs d'attachement peuvent être provoquées par la formation anormale du fuseau mitotique. Pour éviter les erreurs d'attachement et par conséquent les erreurs de ségrégation des chromatides sœurs, le SAC contrôle chaque liaison entre un chromosome et le fuseau.

Dans les cancers, les protéines impliquées dans ce point de contrôle sont souvent surexprimées⁹¹. Par exemple, la surexpression de Mad2 retarde la sortie de mitose et la dégradation de la Cycline B1 et de la sécurine avec pour conséquence la formation de cellules polyploïdes ou aneuploïdes⁹². Il a été montré qu'un retard dans le clivage des cohésines, à cause d'un SAC toujours actif, affecte l'alignement des chromosomes et engendre des erreurs de ségrégation des chromatides sœurs⁹³.

I.4.a Les défauts de symétrie du fuseau mitotique

Pendant les premières étapes de la mitose, plusieurs fuseaux peuvent se former. On parle alors de fuseau mitotique multipolaire. La conséquence de ce type de fuseau est la génération de cellules filles ayant des nombres différents de chromosomes⁹⁴. En effet, comme chaque chromosome contient seulement deux chromatides sœurs, la division d'une cellule en trois, ou plus, entraîne une diminution drastique du nombre de chromosomes dans chaque cellule fille. Par ailleurs, une cellule fille peut également récupérer plus de 23 paires de chromosomes⁹⁵. En effet, une étude a démontré qu'en présence d'un fuseau multipolaire la séparation des chromatides sœurs n'est pas synchronisée et provoque une ségrégation asymétrique des chromosomes. Par conséquent, les cellules filles produites ont un contenu en ADN très variable entre elles.

L'apparition d'un fuseau multipolaire est la conséquence directe d'un nombre anormal de centrosomes. Une amplification des centrosomes peut résulter d'une dérégulation de leur

cycle de réplication. En effet, il a été démontré qu'une surexpression de la protéine kinase Aurora A dans les cancers provoque la formation de centrosomes surnuméraires⁹⁶.

La génération d'un fuseau mitotique multipolaire promeut les attachements mérotéliques, responsables d'apparition de défauts de ségrégation des chromatides sœurs⁹⁷.

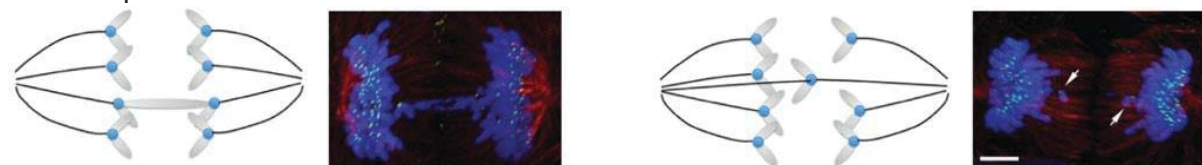
I.4.b Les défauts de ségrégation des chromatides sœurs

I.4.b.1 Les ponts anaphasiques ou *anaphase bridges*

Les ponts anaphasiques ou *anaphase bridges* sont définis comme une « corde » de chromatine tendue d'un pôle à l'autre de la cellule pendant l'anaphase. Elle se forme lorsque le SAC est actif trop longtemps. Dans ce cas de figure, les chromatides sœurs fusionnent juste avant la séparation des centromères en anaphase, ce qui induit un étirement de l'ADN centromérique (**Figure 16**). Le matériel étiré correspond à deux copies en miroir d'un segment d'ADN du même chromosome. Ce segment d'ADN se casse à un ou plusieurs endroits et provoque une perte de matériel génétique⁹⁸.

Les séquences d'ADN cassées peuvent se lier à d'autres extrémités chromosomiques cassées ou à d'autres chromosomes. Plusieurs de ces chromosomes nouvellement formés peuvent être dicentriques, c'est-à-dire posséder deux centromères. A la division cellulaire suivante, ces chromosomes dicentriques seront la cause du même type de mauvaise ségrégation, initiant un cycle de cassures-fusion-pont anaphasique⁹⁹. Ce cycle favorise l'apparition de cellules aneuploïdes ou polyploïdes. En effet, plusieurs études ont montré que ces réarrangements perpétuels du génome provoquent une amplification ou une perte de gènes et altèrent les niveaux d'expression des protéines oncogéniques favorisant la tumorigénèse^{100,101}.

La génération de ponts anaphasiques peut également résulter du raccourcissement des séquences répétées des télomères (TTAGGG) qui provoque la fusion des extrémités télomériques entre chromosomes ou entre chromatides sœurs¹⁰².



Pont anaphasique

Chromosome retardataire

Figure 16 : Représentation schématique et par immunofluorescence d'un pont anaphasique et d'un chromosome retardataire (adaptée de *Bakhoum et al. 2014*¹⁰³). Les flèches blanches indiquent les chromosomes retardataires.

1.4.b.2 Les chromosomes retardataires ou chromosome lagging

Un chromosome retardataire est un chromosome qui n'est pas dans la plaque métaphasique lors de l'alignement des chromosomes. Un chromosome sera en retard à cause d'un attachement mérotélique qui ne satisfait pas le SAC¹⁰⁴. Pour rappel, ces attachements sont favorisés par la formation de fuseaux multipolaires. Malgré ce chromosome non aligné, la cellule peut tout de même enclencher la transition métaphase/anaphase, on parle alors de fatigue des cohésions¹⁰⁵. C'est un processus au cours duquel les chromosomes se séparent en raison des forces exercées sur les kinétochores par les microtubules. Ces chromosomes retardataires ne migrent pas vers les pôles du fuseau en même temps que les autres chromosomes et restent au milieu de la cellule. Ils ne seront pas intégrés dans le noyau nouvellement formé de la cellule fille qui sera aneuploïde¹⁰⁶. Dans certains cas, les chromosomes retardataires sont incorporés dans la cellule fille mais toujours en retard. Ils sont alors intégrés au sein de micronoyaux visualisables en interphase¹⁰⁷.

1.4.b.3 Le dérapage mitotique ou mitotic slippage

Dans les cancers, une surexpression des protéines du SAC provoque un allongement de la durée de la mitose pouvant aboutir à la génération de cellules polyploïdes suite à un dérapage mitotique¹⁰⁸. Les cellules entrent en phase G₁ sans séparation des chromatides sœurs. Ce mécanisme de dérapage mitotique est généré par la dégradation continue de la cycline B1 par le complexe APC/C-Cdc20. En effet, une activation prolongée du SAC rend ce point de contrôle inefficace pour inhiber tous les complexes APC/C-Cdc20. La cycline B1 est lentement détruite jusqu'à atteindre un niveau où l'activité du complexe Cycline B1/CDK1 n'est plus suffisante pour maintenir la phosphorylation inhibitrice de Cdh1. Le complexe APC/C-Cdh1 peut alors initier la dégradation par polyubiquitination des acteurs de la mitose pour déclencher la sortie de mitose et l'entrée des cellules en phase G₁¹⁰⁸. Un arrêt prolongé de la cellule en prométaphase peut également entraîner des cassures chromosomiques en raison d'une tension élevée exercée sur les chromatides sœurs, en absence de dégradation des cohésines¹⁰⁹. Le dérapage mitotique permet ainsi à des cellules anormales (polyploïdes, aneuploïdes ou présentant des dommages à l'ADN) de progresser en mitose et favorise l'émergence d'une population cellulaire porteuse de nombreuses altérations chromosomiques à l'origine de cancers.

I.4.c Les traces des erreurs mitotiques en interphase

Une étude propose une classification des noyaux atypiques présents en interphase en trois catégories : les anneaux nucléaires ou *nuclear string*, les bourgeonnements nucléaires ou *nuclear blebs* et les micronoyaux ou *micronuclei* (**Figure 17**)¹¹⁰.

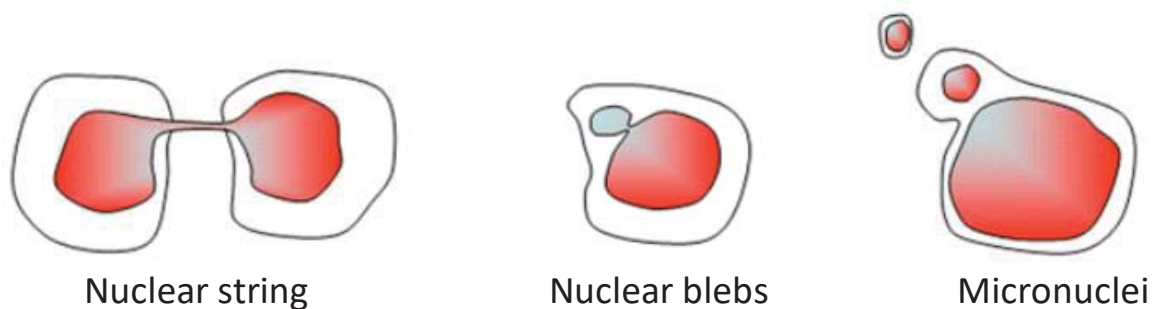


Figure 17 : Schéma des 3 catégories de noyaux interphasiques atypiques (adaptée de Gisselsson et al. 2008¹¹¹).

Les anneaux nucléaires sont caractérisés par la présence d'un fil de chromatine reliant les noyaux de deux cellules. Les bourgeonnements nucléaires possèdent une protrusion ovale de l'enveloppe nucléaire connectée au noyau par un fragment de chromatine. Les micronoyaux sont des fragments de chromatine arrondis adjacents au noyau. Une étude par microscopie en temps réel a montré que ces noyaux anormaux sont la conséquence de ponts anaphasiques¹¹². D'autres études démontrent que les chromosomes retardataires sont à l'origine des micronoyaux et que l'expulsion d'un excès de matériel chromosomique en interphase peut être responsable de la formation de bourgeonnements nucléaires^{113,114}.

L'apparition de ces noyaux anormaux dans une population de cellule est une marque de néoplasie^{115,116}. Ce processus participe au développement et à la prolifération anormale de cellules qui donne lieu à la création d'une tumeur.

I.4.d L'impact des erreurs de ségrégation des chromosomes dans la tumorigénèse

Les erreurs de ségrégation des chromosomes sont la principale cause d'instabilité chromosomique, laquelle se définit par un changement dans la structure et le nombre de chromosomes dans une cellule. Les cellules cancéreuses représentent une classe de cellules porteuses de beaucoup d'instabilité chromosomique. La corrélation entre aneuploïdie et cancer est connue depuis des décennies et la plupart des travaux sont en faveur d'un rôle-clé de l'instabilité chromosomique dans l'initiation d'une tumeur^{117,118,119}. L'aneuploïdie favorise le

développement d'une tumeur suite à la perte ou au gain d'information génétique. L'apparition sporadique d'une tumeur est la conséquence d'une accumulation de différentes altérations génétiques. Pendant la tumorigénèse, les cellules tumorales acquièrent des mutations sur deux types de gènes, les gènes dits « caretaker » qui s'assurent de l'intégrité du génome (gènes codants pour des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN par exemple) et les gènes dits « gatekeeper » qui contrôlent directement la prolifération cellulaire (gène *TP53* par exemple)¹²⁰. Les erreurs de ségrégation des chromosomes peuvent être à l'origine d'une perte d'un ou plusieurs de ces gènes et facilitent ainsi le développement d'une tumeur^{121, 122}.

En conclusion, l'aneuploïdie se développe progressivement à partir d'une mauvaise ségrégation des chromosomes pendant la division d'une cellule diploïde. Une fois qu'un gène « caretaker » et/ou « gatekeeper » est perdu, la probabilité d'une mauvaise répartition des chromosomes est augmentée. Par conséquent une instabilité génomique persistante se met en place, notamment avec l'apparition de mutations ponctuelles faisant suite à l'incapacité de la cellule de réparer et de répliquer correctement son ADN. Cet emballement favorise ainsi la transformation cellulaire.

II. L'E3 ubiquitine ligase TRIP12

II.1 L'ubiquitination

L'ubiquitination des protéines est une modification post-traductionnelle découverte au début des années 1980 par Aaron Ciechanover et ses collaborateurs¹²³. Elle intervient dans plusieurs processus cellulaires tels que la dégradation des protéines, l'endocytose, le changement de localisation subcellulaire, le contrôle de cascades de signalisation, l'interaction protéine/protéine et le devenir des récepteurs cellulaires¹²⁴.

II.1.a La cascade d'ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine stable et conservée de 8,5kDa (76 acides aminés)¹²⁵. Le processus d'ubiquitination consiste au transfert séquentiel de l'ubiquitine d'une enzyme d'activation E1 vers une protéine cible *via* une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2¹²⁴ (**Figure 18**). L'étape initiale d'activation de l'ubiquitine qui requiert de l'ATP, correspond à la formation d'une liaison thioester entre le résidu glycine 76 C-terminal de l'ubiquitine et un résidu cystéine de l'E1. L'ubiquitine activée est ensuite transférée sur une cystéine de l'E2. L'attachement final à la protéine cible se fait après la formation d'un complexe entre l'E2 et

une E3 ubiquitine ligase. Le transfert de l'ubiquitine est soit catalysé directement par l'E2, soit spécifiquement par l'E3. L'ubiquitine est alors attachée au substrat par une liaison isopeptidique entre la glycine 76 et une lysine de la protéine cible. L'E3 ubiquitine ligase joue un rôle critique dans cette cascade, en recrutant l'E2 liée à l'ubiquitine, en reconnaissant spécifiquement le substrat et en facilitant ou catalysant directement le transfert de l'ubiquitine sur la lysine de la protéine cible.

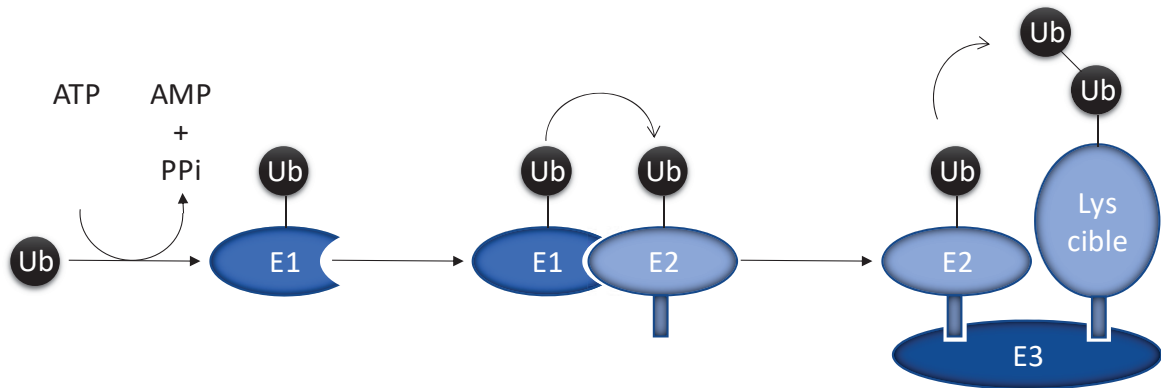


Figure 18 : Cascade d'ubiquitination (adaptée de *Rotin et al. 2009*¹²⁶).

Ub : Ubiquitine, E1 : Enzyme d'activation, E2 : Enzyme de conjugaison, E3 : Ubiquitine ligase.

L'attachement final de l'ubiquitine sur le substrat ne se fait pas obligatoirement sur une lysine. En effet, le « N-end rule » est un système protéolytique qui repose sur l'ubiquitination des premiers acides aminés situés dans la partie N-terminale de la protéine cible¹²⁷. Le signal de dégradation N-terminal est appelé N-degron et nécessite ou non une modification du premier acide aminé de la protéine. En effet, la première méthionine et les « petits » résidus non chargés comme l'alanine, la valine, la sérine, la thréonine et la cystéine doivent être acétylés pour produire un signal de dégradation par le protéasome 26S. L'acide aspartique et l'acide glutamique doivent être également modifiés par arginylation pour induire la dégradation de la protéine. En revanche, d'autres acides aminés dits déstabilisants n'ont pas besoin d'être modifiés (arginine, lysine, histidine, leucine, isoleucine, phénylalanine, tryptophane et tyrosine) pour induire un signal de dégradation.

II.1.b Les différents types d'ubiquitination et leurs rôles physiologiques

L'ubiquitine module différents signaux cellulaires qui contrôlent une grande diversité de processus biologiques. La spécificité du signal de l'ubiquitine est due au type d'ubiquitination. Les protéines peuvent être modifiées sur un ou plusieurs résidus lysine avec une seule molécule d'ubiquitine (mono et multi-monoubiquitination) ou des polymères d'ubiquitine (polyubiquitination) (**Figure 19**). Seule la polyubiquitination entraîne une dégradation des

protéines par le protéasome 26S. Cependant, la polyubiquitination peut également jouer un rôle dans les voies de signalisation en fonction de la lysine de l'ubiquitine utilisée pendant l'élongation (**Tableau 1**). L'ubiquitine contient sept résidus lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) qui servent d'accepteurs pour d'autres ubiquitines, formant ainsi une chaîne de polymères d'ubiquitine. Une chaîne peut également être formée d'ubiquitines liées entre elles par la méthionine 1 N-terminale (M1). Une chaîne comprenant un seul type de liaison (sur la même lysine) est appelée homotypique. Au contraire, les chaînes hétérotypiques contiennent des liaisons par des lysines différentes au sein d'un même polymère (**Figure 19**). Les mono- et multi-monoubiquitinations, quant à elles, jouent uniquement un rôle dans la signalisation cellulaire, notamment dans l'endocytose de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase pour leur dégradation dans les lysosomes et dans la réponse aux dommages à l'ADN via l'ubiquitination des histones et de PCNA^{128,129,130}.

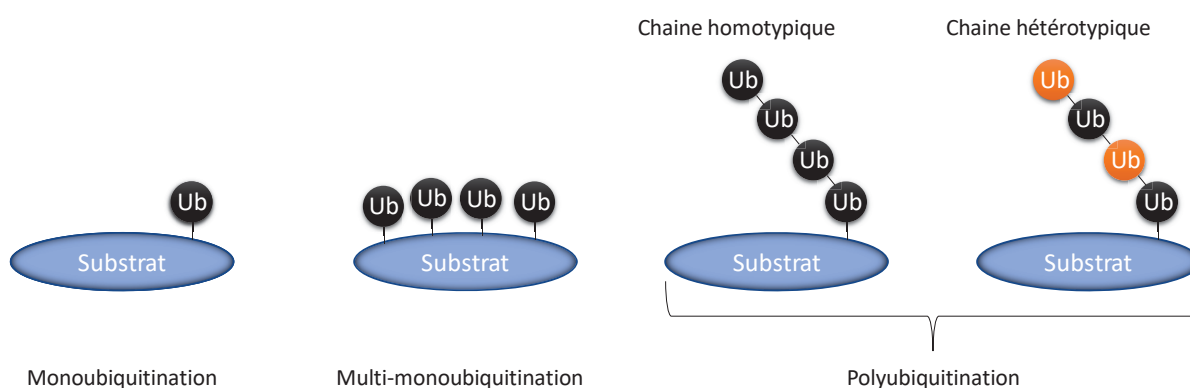


Figure 19 : Les différents types d'ubiquitination.

Les protéines qui interagissent avec l'ubiquitine sont considérées comme des récepteurs de l'ubiquitine. Elles traduisent le message porté par les différents types de chaînes d'ubiquitination en déclenchant des signalisations intracellulaires. Ces protéines possèdent différents domaines spécifiques de reconnaissance et de fixation à l'ubiquitine (*Ubiquitin Binding Domain*)¹³¹. Il en existe différentes classes : les UBDs composées d'hélices α , de motifs à doigts de zinc, de domaines UBC (*Ubiquitin Conjugating domain*) ou de motifs PH (*Plekstrin Homology*). La majorité des UBDs se lie aux acides aminés hydrophobes de l'ubiquitine notamment la leucine 8, l'isoleucine 44 et la valine 70.

De plus, il est important de savoir que l'ubiquitination est une modification réversible et que les liaisons entre les molécules d'ubiquitine et les substrats sont hydrolysées par des déubiquitinases¹³². Chez l'Homme, 90 gènes codent pour des déubiquitinases classées en six familles, la plus vaste étant celle des USPs (*Ubiquitin Specific Proteases*) avec 55 membres¹³³.

II.1.b.1 Les chaines liées par les lysines 48 : polyubiquitination K48

La chaine homotypique la plus étudiée est l'élongation par la conjugaison sur les lysines 48. Elle permet le ciblage des protéines au protéasome 26S, un complexe protéique qui dégrade par protéolyse des protéines qui ne sont plus nécessaires pour la cellule (par exemple les cyclines en fonction de l'étape du cycle cellulaire) ou malformées. Le motif minimum de reconnaissance par le protéasome 26S est la liaison de quatre molécules d'ubiquitine par la lysine 48¹³⁴.

II.1.b.2 Les chaines liées par les lysines 11 : polyubiquitination K11

L'assemblage homotypique K11 peut aussi transmettre un signal de dégradation mais également de relocalisation de protéines dans le cytoplasme¹³⁵.

Le complexe APC/C assemble les chaines homotypiques K11 pour conduire à une dégradation des effecteurs de la mitose par le protéasome et permettre la sortie de mitose. L'abondance de liaisons K11 augmente fortement lorsque APC/C est actif pendant la mitose¹³⁶. Par ailleurs, des chaines hétérotypiques K48 et K11 produites par le complexe APC/C peuvent également adresser un signal de dégradation par le protéasome pour la Cycline B1¹³⁷.

II.1.b.3 Les chaines liées par les lysines 63 : polyubiquitination K63

Les chaines d'ubiquitine K63 transmettent un signal qui n'implique pas une dégradation de la protéine cible par le protéasome. En effet, une polyubiquitination K63 déclenche le processus d'endocytose de récepteurs situés à la surface de la cellule pour les inactiver¹³⁸. Ce type de chaine orchestre également le recrutement de protéines impliquées dans la voie de réparation des dommages après ubiquitination de l'histone H2A par l'E3 ubiquitine ligase RNF8¹³⁹.

II.1.b.4 Les chaines liées par les lysines 6 : polyubiquitination K6

Les fonctions cellulaires des chaines d'ubiquitine liées par les lysines 6 sont encore peu claires. L'inhibition du protéasome n'affecte pas la quantité de protéines polyubiquitinées sur K6 et ne semble donc pas entraîner leur dégradation. La polyubiquitination K6 a été indirectement associée aux événements de réparation de l'ADN via l'E3 ubiquitine ligase BRCA1 (*Breast Cancer 1*). Cette protéine « suppresseur de tumeurs » polyubiquitine ses substrats sans en affecter le niveau d'expression¹⁴⁰.

Plus récemment, une polyubiquitination K6 de protéines membranaires mitochondriales par l'E3 ubiquitine ligase Parkin a été identifiée au moment de la dépolarisation des mitochondries¹⁴¹.

II.1.b.5 Les chaines liées par les lysines 27 : polyubiquitination K27

Des travaux montrent que la polyubiquitination K27 sert de plateforme de signalisation intracellulaire. Par exemple, après un dommage à l'ADN, RNF168 polyubiquitine les histones H2A et H2AX et permet le recrutement de protéines cruciales de la réparation (53BP1, RNF168 et Rap80)¹⁴².

Une deuxième étude connecte cette forme d'ubiquitination à la réponse immunitaire après une infection par un ADN viral. En réponse à cette infection, l'E3 ubiquitine ligase AMFR (*Autocrine Motility Factor Receptor*) polyubiquitine STING (*Stimulator of Interferon Genes*), une protéine transmembranaire située sur le réticulum endoplasmique. Cette polyubiquitination permet le recrutement et l'activation de TBK1 (*TANK-binding Kinase 1*). Par la suite, TBK1 active différentes kinases et le facteur de transcription IRF-3 (*Interferon Regulatory Factor-3*), dans le but de détruire le pathogène¹⁴³.

II.1.b.6 Les chaines liées par les lysines 29 : polyubiquitination K29

Ce type de polyubiquitination provoque une inhibition de la voie de signalisation Wnt. En effet, il a été démontré que l'E3 ubiquitine ligase Smurf1 (*Smad Ubiquitylation Regulatory Factor 1*) polyubiquitine l'Axine, provoquant une perte de son interaction avec les co-récepteurs LRP5 et LRP6 (*Low-density lipoprotein Receptor-related protein*). Par conséquent, la stimulation de la phosphorylation de Wnt sur LRP6 est diminuée et réprime la signalisation Wnt/ β -catenin¹⁴⁴.

II.1.b.7 Les chaines liées par les lysines 33 : polyubiquitination K33

Les polymères d'ubiquitine possédant des liaisons lysines 33 sont associés à une inhibition du TCR (*T-cell antigen Receptor*) et de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*)^{145,146}. Plus récemment, il a été démontré que la polyubiquitination K33 sert de signal d'export de l'appareil de Golgi pour les protéines destinées à la membrane cytoplasmique¹⁴⁷.

Polyubiquitination	Fonctions physiologiques	Exemples d'E3
K6	Réponse aux dommages à l'ADN, dépolarisation mitochondriale	BRCA1 et Parkin
K11	Contrôle du cycle cellulaire	APC/C
K27	Translocalisation nucléaire et réponse aux dommages à l'ADN	RNF168
K29	Signalisation Wnt/ β -caténine	Smurf1
K33	Signalisation du TCR et AMPK, trafic des protéines après modifications dans l'appareil de Golgi	Cul3-KLHL20 et AREL1
K48	Signal de dégradation par le protéasome	SCF et E6-AP
K63	Endocytose, immunité innée, signalisation NF- κ B et trafic intracellulaire des protéines	TRAF6

Tableau 1 : Types de liaison de l'ubiquitine et rôles physiologiques (adapté de *Akutsu et al. 2016¹⁴⁸*).

Bien qu'il existe une vision détaillée de la fonction cellulaire affectée pour chaque type de chaîne d'ubiquitination, le mécanisme par lequel une E3 ubiquitine ligase choisit sa chaîne de polyubiquitination reste encore imprécis. Une étude a démontré que le choix du type de chaîne d'ubiquitination dépend de l'E3 ubiquitine ligase elle-même et non de sa famille ou de l'E2 de conjugaison¹⁴⁹. Dans cette étude, la spécificité du type de chaîne est donnée par les 60 derniers acides aminés du domaine catalytique de l'E3 ubiquitine ligase. Cependant, une étude plus récente souligne que le domaine permettant une spécificité de type de chaîne d'ubiquitine n'est pas partagé entre toutes les E3 ubiquitine ligases et qu'il peut se trouver à un autre endroit de la séquence protéique¹⁵⁰.

II.2 Les E3 ubiquitine ligases

II.2.a Les différentes familles

Comme ce sont les E3 ubiquitine ligases qui dictent la spécificité du système d'ubiquitination et du substrat choisi, l'organisme contient un grand nombre d'E3 mais à l'inverse peu d'E1 et E2. A ce jour, le génome humain code pour 2 E1, approximativement 38 E2 et jusqu'à 600 E3¹⁵¹. Les E3 sont subdivisées en trois groupes selon leur mode de liaison de l'ubiquitine (**Figure 20**).

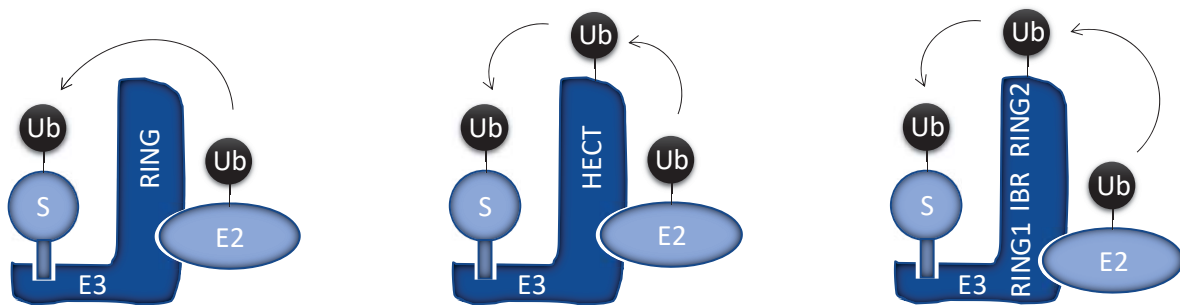


Figure 20 : Les trois familles d'E3 ubiquitine ligases.

De gauche à droite : Les familles HECT, RING et RBR.

Ub : Ubiquitine, S : Substrat, E1 : Enzyme d'activation, E2 : Enzyme de conjugaison, E3 : Ubiquitine ligase

II.2.a.1 Les E3 ubiquitine ligases de la famille RING

Environ 95% (600 membres) des E3 ubiquitine ligases appartiennent à la famille RING (*Really Interesting New Gene*). Elles servent de plateforme pour faciliter l'interaction entre le substrat et l'E2. Il existe deux types d'E3 ubiquitine ligase dans cette famille : les protéines possédant un domaine RING et celles qui possèdent un domaine U-box (*UFD2-Homology*).

Le domaine RING nécessite deux ions Zinc pour adopter une structure en forme de croisillon permettant son interaction avec l'E2. Les E3 de cette famille ne possèdent pas d'activité catalytique et comptent sur celle des E2 pour transférer l'ubiquitine sur la protéine cible. Il existe une très grande diversité d'E3 RING. En effet, certains domaines RING sont actifs sous forme de monomères, comme RNF38, alors que d'autres domaines sont actifs sous forme d'oligomères¹⁵². Par exemple, TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*) est seulement active lorsqu'elle est homodimérisée¹⁵³. Ces E3 ubiquitine ligases peuvent également être un ensemble de sous-unités formant un complexe. C'est le cas d'APC/C, un important complexe de 14 sous unités, comprenant entre autres l'E3 RING APC11 et un co-activateur (Cdc20 ou Cdh1) qui recrute le substrat¹⁵⁴.

Les E3 ubiquitine ligases U-Box utilisent le même mécanisme de transfert de l'ubiquitine et possèdent la même structure que le domaine RING sans avoir besoin des deux ions Zinc¹⁵⁵. Chez l'Homme, il existe 8 E3 U-box qui fonctionnent sous forme de monomère telles que UBE4B (*Ubiquitin conjugation factor E4B*) tandis que d'autres nécessitent une dimérisation pour exercer leur activité telle que PRP19 (*Precursor RNA processing 19*)^{151,156},¹⁵⁷.

II.2.a.2 Les E3 ubiquitine ligases de la famille HECT

Chez l'Homme, il existe 28 E3 ubiquitine ligases de la famille HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*)¹²⁶. Le domaine HECT est localisé dans la partie C-terminale de ces protéines. Le reste de la protéine contient différents domaines dont ceux nécessaires aux interactions protéines-protéines. Contrairement aux autres familles d'E3, la famille HECT catalyse directement le transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible. Ceci est exclusivement dû au domaine HECT qui contient deux lobes connectés par une boucle flexible¹⁵⁸. Le lobe N-terminal interagit avec l'E2 conjuguée à l'ubiquitine alors que le lobe C-terminal contient la cystéine catalytique sur laquelle l'ubiquitine va être transférée. La boucle flexible permet la rotation des deux lobes pendant le transfert de l'ubiquitine.

Cette famille est subdivisée en trois groupes en fonction des domaines d'interaction protéine/protéine localisés dans la partie N-terminale de l'E3 (**Figure 21**) :

- La famille NEDD4 (*Neural precursor cell expressed Developmentally Down-regulated protein 4*) (9 membres), caractérisée par la présence de domaines WW (tryptophane/tryptophane) qui interagissent avec les motifs PY (trois prolines et une tyrosine) du substrat¹⁵⁹.
- La famille HERC (*HECT and RCC1-like domain*) (6 membres) contient des domaines RLDs (*Regulator of Chromosome Condensation 1 Like Domains*) qui ne sont pas encore bien caractérisés¹⁶⁰.
- Le troisième groupe (13 membres) contient différents domaines d'interaction, tels que les domaines WWE (tryptophane/tryptophane/glutamate), les répétitions ankyrines ou encore les domaines à doigts de zinc.

II.2.a.3 Les E3 ubiquitine ligases de la famille RBR

Chez l'Homme, il existe 14 E3 ubiquitine ligases RBR (*RING-Between-RING*) qui possèdent toutes un motif RING1-IBR (*In Between Ring*)-RING2¹⁶¹. Des premières études ont montré que ce domaine est essentiel à la liaison avec l'E2 et à l'activité ubiquitine ligase. Le mécanisme d'ubiquitination est encore flou mais semble similaire aux E3 ubiquitine ligases de la famille RING¹⁶². Cependant en 2011, une cystéine portant l'activité catalytique a été identifiée dans le domaine RING2 de l'E3 ubiquitine ligase RBR Parkin¹⁶³. Elle forme, comme les E3 ubiquitine ligases de la famille HECT, une liaison thioester avec la partie C-terminale de l'ubiquitine.

Ces données redéfinissent cette famille comme un hybride entre les familles RING et HECT, qui recrute l'E2 conjuguée avec l'ubiquitine sur le domaine RING1 et la transfère sur la cystéine catalytique du domaine RING2 permettant ainsi l'attachement final de l'ubiquitine sur le substrat.

II.2.b Les dérégulations de l'ubiquitination dans les cancers

La réponse d'une cellule aux signaux de stress et aux dommages à l'ADN dépend beaucoup de l'activité des E3 ubiquitine ligases, qui comme nous l'avons vu, régulent de nombreux processus cellulaires tels que l'homéostasie, le métabolisme et la progression du cycle cellulaire. Différentes altérations sont responsables de la dérégulation des E3 dans le cancer et par conséquent de la stabilité et/ou l'activité de leurs substrats. Cela peut dans certains cas, mener à la diminution de l'expression des protéines à activité « supresseurs de tumeurs » et/ou à l'augmentation de l'expression de protéines à activité oncogénique.

II.2.b.1 Les mécanismes dérégulant l'ubiquitination dans le cancer

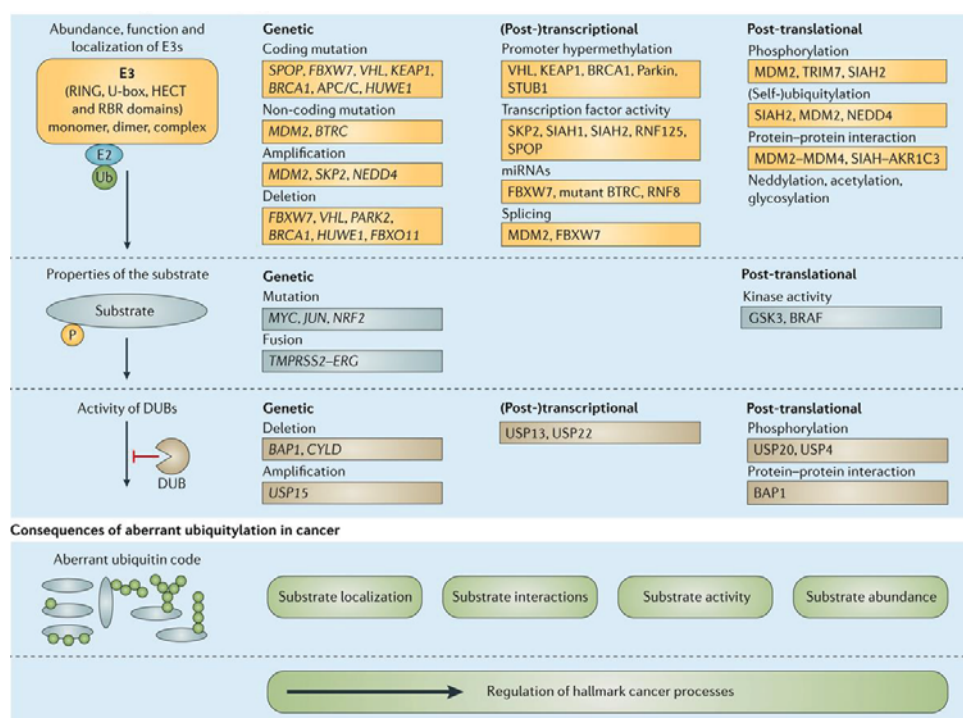


Figure 21 : Mécanismes responsables de la dérégulation de l'ubiquitination dans le cancer (de Senft et al. 2018¹⁶⁴).

L'activité et l'expression de beaucoup d'E3 sont dérégulées dans les cancers par des mécanismes génétiques, épigénétiques, transcriptionnels et post-transcriptionnels¹⁶⁵. Plusieurs gènes codant pour des E3 sont mutés et ces mutations sont associées à des cancers familiaux. C'est le cas, du gène codant pour la protéine VHL¹⁶⁶ (*Von Hippel-Lindau disease*

tumor suppressor) dans le carcinome rénal ou du gène codant pour BRCA1 dans les cancers du sein et ovarien¹⁶⁷. Des études à grande échelle du génome de divers cancers ont identifié d'autres E3 dont le gène est altéré par des mutations ou un changement du nombre de copies (**Figure 21**). L'abondance et l'activité des E3 ubiquitine ligases peuvent être également régulées par des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, ubiquitinations) ou par des interactions protéines/protéines. Par exemple, la phosphorylation de l'E3 ubiquitine ligase de la famille RING Siah2 (*Seven In Absentia Homolog*) par la protéine kinase p38 contrôle la stabilité de plusieurs facteurs impliqués dans la réponse à un stress hypoxique. En effet, cette phosphorylation entraîne la relocalisation de Siah2 dans les régions périnucléaires et permet l'interaction avec sa cible¹⁶⁸. Une autre étude montre l'importance de l'interaction de l'E3 ubiquitine ligase MDM2 (*Mouse Double Minute 2*) avec son co-activateur MDMX (*Mouse Double Minute X*) pour passer d'une monoubiquitination à une polyubiquitination de la protéine « supprimeur de tumeurs » p53 et entraîner ainsi sa dégradation¹⁶⁹.

Comme décrit précédemment, l'ubiquitination est une modification post-traductionnelle réversible. Les déubiquitinases (DUBs) responsables de l'hydrolyse de l'ubiquitine peuvent être également dérégulées dans les cancers¹⁷⁰ (**Figure 21**). C'est le cas de la protéine USP15 (*Ubiquitin Specific Protease 15*) qui est surexprimée chez les patients atteints de cancer du sein et de lymphome¹⁷¹. Cette déubiquitinase est connue pour stabiliser l'E3 ubiquitine ligase MDM2 dans les cellules cancéreuses favorisant ainsi la survie cellulaire et l'inhibition de la réponse immunitaire T dépendante anti-tumorale¹⁷².

En plus de la dérégulation des E3 et des DUBs, l'ubiquitination est modulée par des mutations géniques et des modifications post-traductionnelles de certains substrats (**Figure 21**). Il a été démontré que la phosphorylation de la thréonine 58 du facteur de transcription c-Myc par GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) provoque une polyubiquitination par FBXW7 (*F-Box/WD repeat-containing protein 7*) et sa dégradation par le protéasome. Dans les cas de lymphome, la thréonine 58 de c-Myc est le site de mutation le plus fréquent. Dans ce cas de figure, c-Myc n'est plus dégradée par FBXW7 et peut exercer ses fonctions sur la prolifération cellulaire pendant la tumorigénèse¹⁷³.

L'ubiquitination est un processus dynamique et réversible qui répond à une grande variété de signaux de stress tels que les dommages à l'ADN, l'hypoxie, le stress métabolique et oxydatif. Ces signaux de stress sont rencontrés dans les cellules cancéreuses pendant la transformation, la dissémination métastatique et en réponse à la thérapie. Chaque altération du système d'ubiquitination (décrite ci-dessus et **Figure 21**) entraîne une aberration dans la chaîne d'ubiquitine du substrat. Cette aberration de chaîne altère la localisation, l'activité et

l'abondance des protéines ciblées par l'ubiquitination qui par conséquent dérégule les différentes voies impliquées dans le cancer.

II.2.b.2 Les processus affectés par une dérégulation des E3 dans le cancer

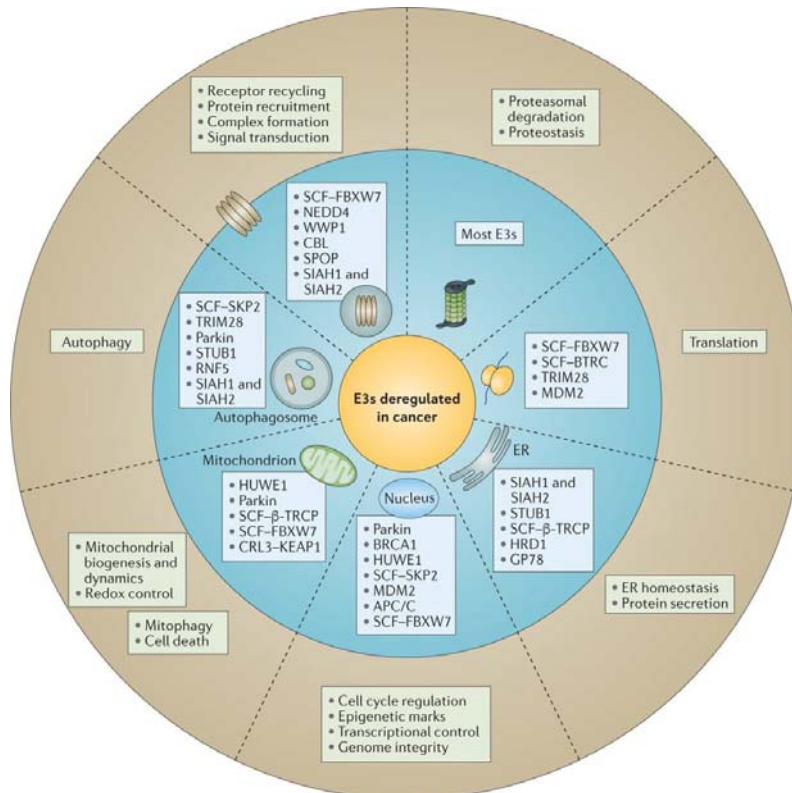


Figure 22 : Exemples d'E3 ubiquitine ligases et des processus cellulaires dérégulés dans le cancer (de Senft et al. 2018¹⁶⁴).

Comme les E3 ubiquitine ligases possèdent de multiples substrats, une perte ou un gain de fonction de ces enzymes affectent simultanément plusieurs fonctions biologiques (**Figure 22**). Une altération de leur expression ou des modifications post-traductionnelles jouent un rôle clé dans les fonctions spatio-temporelles des E3. Elles peuvent déréguler l'activité d'une E3 et affecter les processus cellulaires dépendant des protéines dites « suppresseur de tumeurs » ou à activité oncogénique. Par exemple, FBXW7 est une protéine dite « suppresseur de tumeurs » critique dans les cancers car elle induit la dégradation par le protéasome de la Cycline E, du facteur de transcription oncogénique c-Myc, du récepteur Notch, de la molécule de signalisation mTOR ou encore du régulateur de l'apoptose MCL1 (*Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein 1*)¹⁷⁴. Par conséquent, une perte d'activité de FBXW7 entraîne de l'instabilité génomique, une augmentation de la prolifération et de la survie ainsi qu'une reprise des programmes de transcription dépendant de c-Myc dans les cellules cancéreuses.

II.2.b.3 Le ciblage des E3 ubiquitine ligases, une approche thérapeutique du cancer

Au cours des vingt dernières années, le système ubiquitine/protéasome a été la cible de nombreux nouveaux médicaments anticancéreux. La première thérapie testée chez l'Homme est un inhibiteur du protéasome, le Bortezomib (Velcade®). Synthétisé en 1995, testé en essais cliniques en 1998, il est mis sur le marché dans le traitement du myélome multiple en 2003¹⁷⁵. L'activité anti-tumorale de cet inhibiteur en clinique est bien établie, en utilisation seule ou en combinaison pour le myélome multiple et également pour les patients atteints de lymphome à cellules du manteau. Un autre inhibiteur du protéasome a été autorisé aux Etats-Unis pour le traitement des rechutes du myélome multiple, le Carfilzomib, un dérivé naturel de l'époxomicine qui a montré des effets anti-inflammatoires et d'inhibition du protéasome. Cependant, comme souvent avec les thérapies anticancéreuses, des résistances se développent rapidement¹⁷⁶. L'apparition de résistances mais aussi d'effets secondaires est principalement due aux effets pléiotropiques de l'inhibition. En effet, inhiber le protéasome affecte plus d'une seule voie de signalisation ou protéine. Ceci augmente la probabilité d'engendrer des effets secondaires et souligne la nécessité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer.

Une cible idéale doit posséder les critères suivants :

- Jouer un rôle essentiel dans la carcinogénèse, être requise dans le maintien du phénotype cancéreux et/ou protéger les cellules tumorales de l'apoptose.
- Être activée ou surexprimée dans les cellules cancéreuses et être associée à un mauvais pronostic.
- Son inhibition doit induire une diminution de la croissance cellulaire et l'apoptose des cellules cancéreuses.
- Pouvoir être ciblée par un inhibiteur, c'est-à-dire être une enzyme, une protéine G couplée à des récepteurs ou une molécule à la surface des cellules.
- Elle doit être peu ou pas exprimée dans la cellule saine où son inhibition doit avoir le moins d'effet possible.

L'inhibition de ce genre de cible doit apporter un intérêt thérapeutique maximal avec un minimum de toxicité. Comme nous l'avons vu ci-dessus, les E3 ubiquitine ligases possèdent une grande partie de ces critères. Qui plus est, elles sont le centre du processus d'ubiquitination et possèdent un grand choix de substrats spécifiques, offrant une superbe opportunité de découvrir et de développer des inhibiteurs sélectifs. Inhiber l'activité catalytique ne semble pas être une bonne solution puisque tous les substrats de l'E3 ubiquitine ligase en question ne seront plus ubiquitinés. Créer des inhibiteurs spécifiques de l'interaction

(antagonistes) entre l'E3 ubiquitine ligase et une cible spécifique semble être une meilleure alternative. Cela permet d'éviter tout effet indésirable sur d'autres protéines et voies de signalisation. Il existe différents agents ciblant les E3 ubiquitine ligases, le plus souvent des antagonistes, détaillés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**).

Classe	Nom du médicament	Cible	Application
E3 immuno-modulateurs	Thalidomide	CRBN	AMM (Myélome multiple)
	Lenalidomide	CRBN	AMM (Myélome multiple)
	Pomalidomide	CRBN	AMM (Myélome multiple)
E3-p53 potentiators	Nutlin-3a	MDM2	Plusieurs Phases I
	RG7112	MDM2	Phase I
	ATSP-7041	MDM2/MDMX	Préclinique
	NSC207895	MDM2/MDMX	Préclinique
E3-F-box antagoniste	NSC689857	Skp2	<i>In vitro</i>
	NSC681152	Skp2	<i>In vitro</i>
	SCF-I2	Cdc4	<i>In vitro</i>
	C1, C2, C16, C20	Skp2	Préclinique (Mélanome)
	Composé A	Skp2	Préclinique (Myélome multiple)
	Composé ZL25	Skp2	Préclinique (cancers du sein, poumons et prostate)
	GS143	β TRCP	<i>In vitro</i>
	Erioflorine	β TRCP	<i>In vitro</i>
	BC-1215	Fbxo3	Préclinique
	SMER3	Met30	Préclinique

Tableau 2 : Composés ciblant les E3 ubiquitine ligases (adapté de *Morrow et al. 2015¹⁷⁷*).

La compréhension des mécanismes d'ubiquitination et la connaissance de la structure et des fonctions des E3 ubiquitine ligases vont améliorer le développement de composés ciblant ce processus. Il existe plus de mille protéines impliquées dans le système ubiquitine/protéasome et les E3 ubiquitine ligases représentent une grande partie de ces protéines (environ 650).

II.3 La découverte et la structure de la protéine TRIP12

II.3.a La découverte de la protéine

La protéine TRIP12 (*Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12*) a été identifiée en 1995, sans être caractérisée, lors d'une étude qui recherchait les protéines interagissant avec les récepteurs aux hormones thyroïdiennes¹⁷⁸. Quinze protéines appartenant à plusieurs familles ont été isolées. L'étude démontre que TRIP12 interagit avec le récepteur TR β 2 sans affecter son activité. Il est également décrit que TRIP12 possède 45% d'identité avec la partie C-terminale de la protéine E6-AP, laquelle forme un complexe avec HPV-16 E6 (*Human PapillomaVirus*) pour catalyser la polyubiquitination de p53 et sa dégradation par le protéasome^{179,180}.

II.3.b L'expression et la structure protéique de la protéine TRIP12

II.3.b.1 L'expression de l'ARNm et de la protéine TRIP12 chez l'Homme

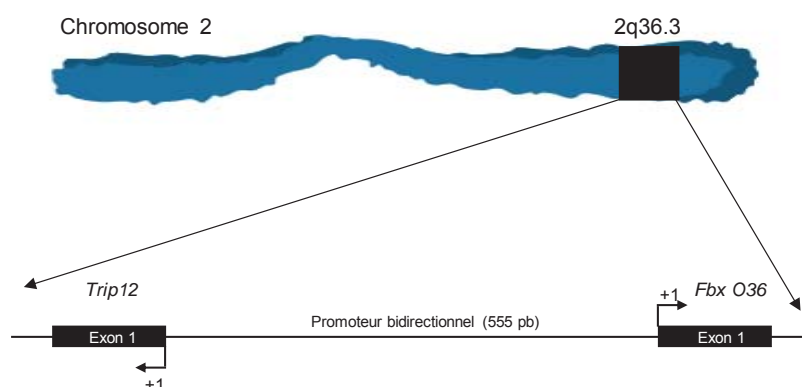


Figure 23 : Localisation du gène *Trip12* sur le chromosome 2.

Le gène codant pour *Trip12* est très conservé à travers les espèces et est localisé sur le bras long du chromosome 2, locus q36.3. Le promoteur qui mesure 555 paires de bases est bidirectionnel, c'est-à-dire qu'il régule l'expression des gènes *Fbx-O36* et *Trip12* situés en orientation opposé (**Figure 23**). A ce jour, aucune étude de son promoteur n'a été réalisée. Le

gène *Trip12* possède 41 exons répartis sur 160 000 paires de bases chez l'Homme. L'ARNm de référence (*NM_004238.3*) comporte 9875 paires de bases et produit une protéine TRIP12 de 1992 acides aminés (*NP_004229.1*), soit environ 225 kDa.

Chez l'Homme, il existe 44 variants de TRIP12 qui ont des tailles différentes. Le plus petit variant de TRIP12 est constitué de 1722 acides aminés alors que le plus grand en possède 2091. Mes travaux de thèse se focalisent sur le l'isoforme c de TRIP12 (*NP_004229.1*) retrouvée dans l'interactome de PTF1a (*Pancreas Transcription Factor 1a*) par l'équipe¹⁸¹. L'expression (ARNm et protéine) de TRIP12 est ubiquitaire dans les tissus. Son niveau est globalement constant, avec cependant une expression plus forte dans les testicules et plus faible dans les tissus adipeux et pancréatiques (**Figure 24**).

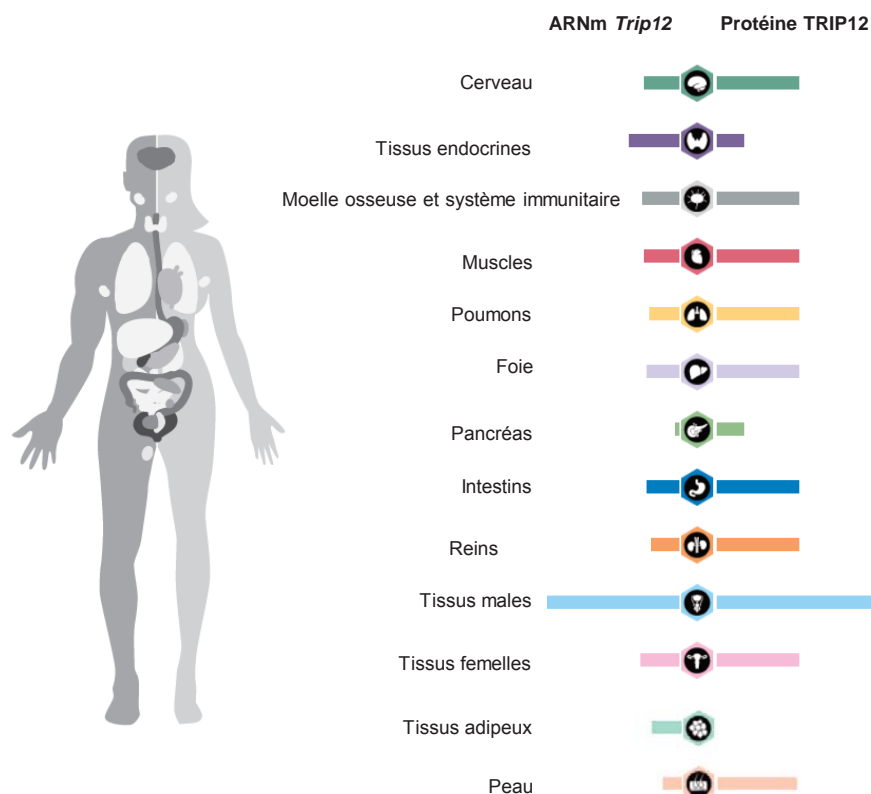


Figure 24 : Niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine TRIP12 dans les tissus humains (adaptée de *The Human Protein Atlas*).

II.3.b.2 La structure de la protéine TRIP12

Plusieurs années après l'identification de TRIP12, deux études de 2001 et 2007 apportent de nouvelles données sur sa structure protéique. Elles montrent que TRIP12 possède un domaine WWE et un domaine β -Armado^{182,183}. Le domaine WWE, situé entre les acides aminés 749 et 836, est une région globulaire composée d'une répétition en tandem d'environ 80 acides aminés avec en son centre deux résidus tryptophane (W) et un résidu

glutamate (E) conservés. Les parties C et N-terminales du domaine forment des feuillets β , alors que la partie centrale est une hélice α nécessaire à l'interaction de TRIP12 avec ses partenaires. Le domaine β -Armadillo est constitué de trois répétitions en tandem d'environ 40 acides aminés formant trois hélices α . Ce domaine est situé entre les acides aminés 446 et 631 et permet l'interaction de TRIP12 avec la partie N-terminale de l'ubiquitine attachée au substrat pour réaliser la polyubiquitination (**Figure 25**). Ces premières caractérisations, en plus de l'homologie de TRIP12 avec E6-AP, étaient en faveur d'une fonction de TRIP12 dans la polyubiquitination et la dégradation des protéines.

Les premières études qui prouvent un rôle direct de TRIP12 dans le système d'ubiquitination ne datent que de 2008 et 2009. En effet, un même groupe démontre que TRIP12 est une E3 ubiquitine ligase de type HECT et que ce domaine situé dans la partie C-terminale entre l'acide aminé 1552 et 1992 porte l'activité catalytique^{184, 185} (**Figure 25**).

A ce jour les domaines WWE, β -Armadillo et HECT sont les seuls domaines de TRIP12 caractérisés dans la littérature.

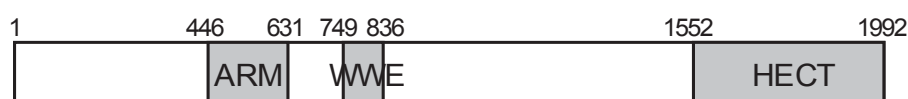


Figure 25 : Séquence protéique de la protéine TRIP12.

Numéros : position de l'acide aminé

ARM : domaine β -Armadillo, WWE : deux résidus tryptophane et un résidu glutamate, HECT : domaine catalytique de l'E3 ubiquitine ligase TRIP12.

II.3.b.3 La conservation de la protéine TRIP12 entre les espèces

Selon l'espèce, la protéine TRIP12 peut porter un nom différent, tel que circadian trip (*Drosophila melanogaster*), KAK (*Arabidopsis thaliana*) et Ubiquitin fusion degradation protein 4 (*Saccharomyces cerevisiae*) (**Figure 26**). La séquence en acides aminés est très conservée chez les Vertébrés, allant de 79.9% d'identité avec la protéine TRIP12 humaine pour le poisson zèbre à 97.6% pour la souris. Ce pourcentage chute fortement chez les Invertébrés, étant de seulement 39% pour la drosophile, 31.1% pour *Arabidopsis thaliana* et de 25.6% pour la levure. La taille de la protéine varie également entre les espèces, la plus grande est observée chez la drosophile (2736 aa) tandis que la plus petite séquence est retrouvée chez la levure (1483 aa). Les domaines HECT et β -Armadillo sont retrouvés chez toutes les espèces contrairement au domaine d'interaction protéine/protéine WWE qui est retrouvé chez tous les Vertébrés mais uniquement chez la drosophile pour les Invertébrés.

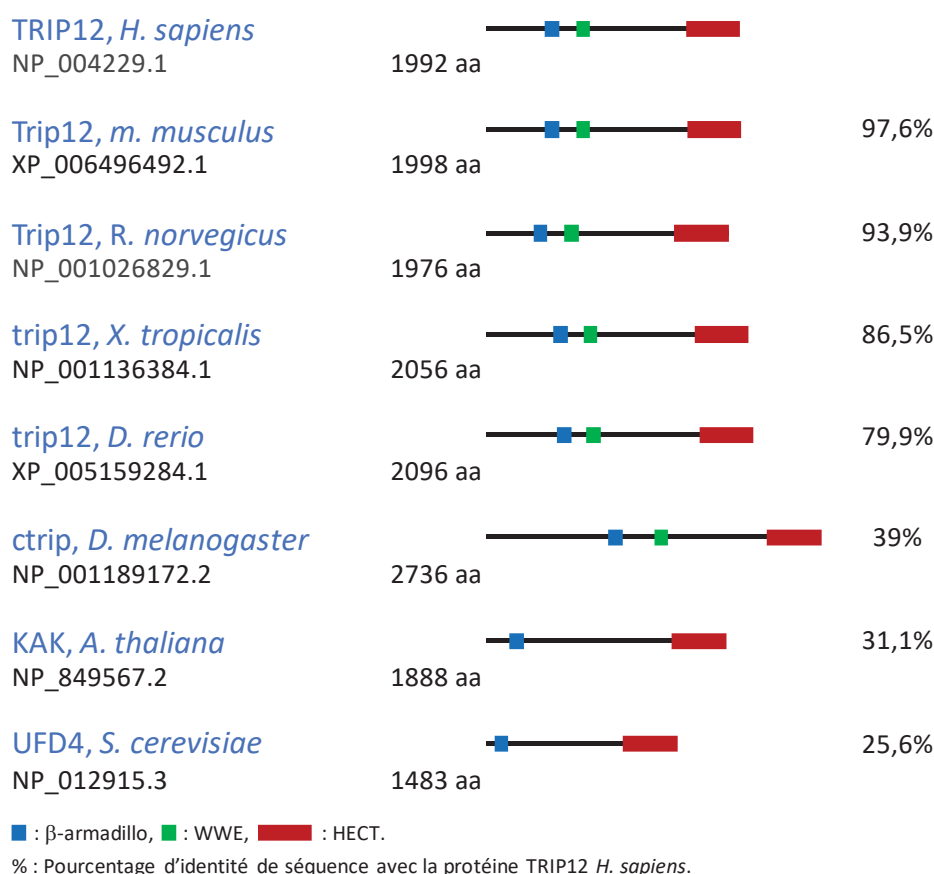


Figure 26 : Les orthologues de la protéine TRIP12 humaine.

La protéine TRIP12 est également retrouvée chez les Planaires (vers plats aquatiques). En effet, une étude a démontré la nécessité de TRIP12 pour la régénération des tissus postérieurs et la régulation des cellules souches de *Schmidtea mediterranea*¹⁸⁶.

De manière intéressante les domaines β -Armadillo et HECT, indispensables à la polyubiquitination, sont présents chez les espèces les moins évoluées démontrant l'importance de l'activité E3 ubiquitine ligase de TRIP12 au cours de l'évolution. Le domaine WWE, quant à lui, n'apparaît qu'au moment où les organismes commencent à se complexifier suggérant l'interaction de TRIP12 avec de nouvelles cibles ou partenaires et de nouvelles fonctions.

II.3.b.4 Les modifications post-traductionnelles de la protéine TRIP12

TRIP12 est une protéine subissant des modifications post-traductionnelles. La base de données PhosphoSitePlus® (<https://www.phosphosite.org>) référence les acides aminés de TRIP12 modifiés de façon post-traductionnelle qui ont été identifiés lors d'études protéomiques à grande échelle (**Figure 27**). Parmi ces modifications, les plus retrouvées sont les

phosphorylations et les ubiquitinations. TRIP12 peut être également acétylée et mono-méthylée. De manière intéressante, les modifications post-traductionnelles semblent se localiser au niveau de 3 régions différentes de la séquence protéique de TRIP12. Les phosphorylations sont prédominantes au niveau de l'extrémité N-terminale et du domaine WWE jusqu'au domaine HECT alors que les ubiquitinations le sont sur le domaine catalytique HECT. Certaines phosphorylations ont été attribuées à des kinases telles que les phosphorylations S424, S1078 et S1577 par les kinases CDK1, CHK1 et ATM/ATR, respectivement^{187,188,189}. Toutefois, aucun effet de ces modifications sur les fonctions de TRIP12 n'a été décrit dans la littérature.

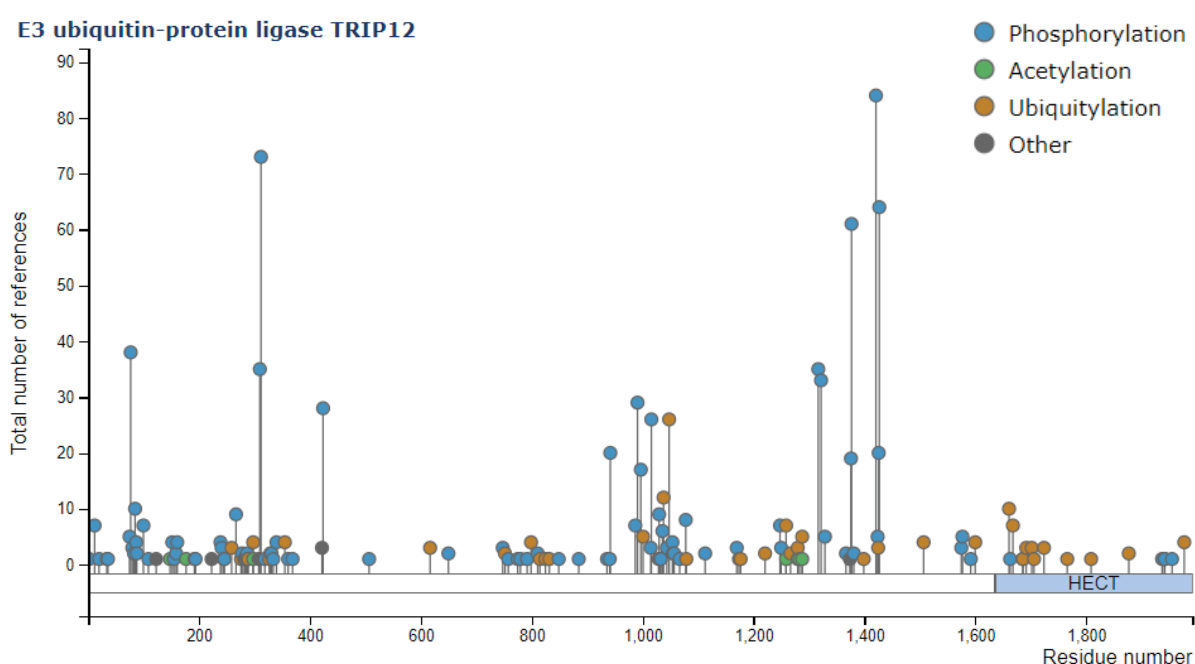


Figure 27 : Modifications post-traductionnelles de la protéine TRIP12 (de *PhosphoSitePlus*[®]).

II.4 Les fonctions de la protéine TRIP12

II.4.a Le rôle de la protéine TRIP12 dans le cancer du pancréas

Le cancer du pancréas est la 4^{ème} cause de décès par cancer. Ce mauvais pronostic s'explique par le manque de traitements réellement efficaces, l'absence d'un diagnostic précoce et par une compréhension incomplète des mécanismes moléculaires qui régissent l'initiation, la progression et la résistance à la plupart des chimiothérapies. Mon équipe d'accueil a montré une surexpression de la protéine TRIP12 dans le cancer du pancréas et les lésions préneoplasiques (données non publiées). Cette surexpression s'avère très

hétérogène entre les patients et au sein de lignées cellulaires dérivées de patients (données non publiées). L'équipe a mis en évidence que TRIP12 contrôle la stabilité du facteur de transcription PTF1a (*Pancreas Transcription Factor 1a*)¹⁸¹. PTF1a, essentiel au développement et à l'homéostasie du pancréas est considéré comme un gène suppresseur de tumeur¹⁹⁰. C'est la première fois qu'une régulation post-traductionnelle de PTF1a a été décrite. L'interaction entre TRIP12 et PTF1a est possible grâce aux domaines WWE et β -Armadillo de TRIP12. La dégradation de PTF1a est engendrée après polyubiquitination de son résidu K312 par TRIP12.

La surexpression de TRIP12 dès les stades prénéoplasiques de l'adénocarcinome pancréatique pourrait expliquer la perte d'expression de PTF1a observée au cours de la carcinogénèse, ce qui fait de TRIP12 un acteur de la carcinogénèse pancréatique.

II.4.b Le rôle de la protéine TRIP12 dans la voie de signalisation ARF/p53

II.4.b.1 Dans une cellule normale

La voie d'activation de la protéine « suppresseur de tumeurs » p53 dépendante d'ARF (*Alternative Reading Frame*) est un déterminant majeur dans la protection contre le développement tumoral. Dans une cellule normale, l'activité de p53 est supprimée par l'action de l'E3 ubiquitine ligase MDM2 qui la cible pour induire sa dégradation par le protéasome. La protéine ARF se fixe à MDM2 pour inhiber son action sur p53. L'interaction ARF/MDM2 provoque ainsi une augmentation du niveau d'expression de p53 qui induit des mécanismes de défense tels que l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire¹⁹¹. La nucléophosmine (NPM) est une protéine majeure des nucléoles qui stabilise ARF (**Figure 28**)¹⁹². Gu Wei et ses collaborateurs ont analysé par spectrométrie de masse les complexes protéiques qui interagissent avec NPM dans le but d'identifier les protéines jouant un rôle sur la stabilité d'ARF¹⁹³. Les auteurs identifièrent TRIP12 et démontrèrent qu'elle est l'E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation d'ARF. Ils renommèrent TRIP12 *Ubiquitin ligase for ARF* (ULF). La perte d'expression de TRIP12 augmente la stabilité d'ARF qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression de p53 et d'un arrêt du cycle cellulaire. Ces auteurs ont également examiné la relation entre TRIP12 et deux régulateurs positifs d'ARF : c-Myc et NPM. En effet, NPM séquestre ARF dans les nucléoles le rendant inaccessible à l'action de TRIP12 présent uniquement dans le nucléoplasme (**Figure 28**). Quant à c-Myc, elle augmente la demi-vie d'ARF en déstabilisant l'interaction entre TRIP12 et ARF (**Figure 28**). Plus récemment, une étude a démontré que la nucléostémine stabilise le complexe NPM/ARF dans les nucléoles et déstabilise le complexe TRIP12/ARF dans le nucléoplasme dans le but d'éviter

une dégradation d'ARF¹⁹⁴. La translocation d'une autre protéine TRADD (*TNF-R associated death domain protein*) du cytoplasme vers le noyau protège également ARF d'une dégradation en empêchant son interaction avec TRIP12¹⁹⁵.

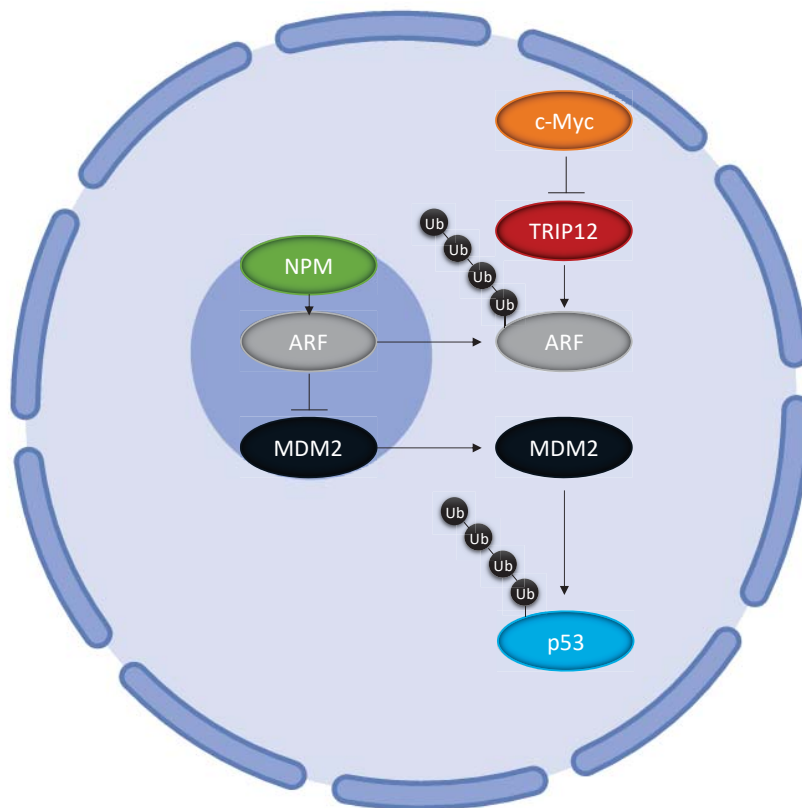


Figure 28 : TRIP12 dans la voie d'activation de p53 dépendante d'ARF.

TRIP12 polyubiquitine ARF et provoque sa dégradation. ARF est protégée de TRIP12 par fixation à NPM localisée dans les nucléoles où ARF inhibe MDM2, l'E3 ubiquitine ligase de p53. C-Myc inhibe l'interaction entre ARF et TRIP12 et induit une stabilisation d'ARF.

Ces données positionnent TRIP12 comme un nouveau senseur de stress oncogénique en amont de la protéine ARF. Une étude s'est intéressée à la régulation de l'activité de TRIP12 lorsqu'une cellule normale est soumise à un stress oncogénique¹⁹⁶. Elle révèle que l'ubiquitination d'ARF par TRIP12 agit comme une barrière contre un stress oncogénique en fonction du niveau d'expression de c-Myc. Une faible expression de c-Myc favorise la prolifération cellulaire en activant seulement la transcription d'ARF, sans affecter son interaction avec TRIP12 et donc l'activation de la voie p53. Au contraire, une forte expression de c-Myc active à la fois la transcription d'ARF et stabilise la protéine en inhibant son interaction avec TRIP12. Ceci active la voie p53 et induit une inhibition de la prolifération cellulaire.

TRIP12 peut également présenter une activité pro-oncogénique si son expression ou son activité est dérégulée. En effet, une surexpression de cette E3 ubiquitine ligase engendre une forte dégradation d'ARF et sensibilise les cellules à un stress oncogénique. Dans ce cas,

inhiber l'activité de la protéine TRIP12 pourrait offrir une nouvelle stratégie thérapeutique dans le cancer.

II.4.b.2 Dans les cancers

II.4.b.2.a Dans les leucémies aigües myéloïdes

Restaurer l'activité de p53 est un but important dans la quête d'une thérapie efficace contre le cancer. Le gène *TP53* est muté dans 50% des tumeurs humaines, mais dans moins de 10% des leucémies aigües myéloïdes (LAM). Une mutation du gène codant pour la protéine ARF est également très rare et suggère que la voie ARF/p53 peut être inactivée par d'autres mécanismes. L'ARNm de TRIP12 est significativement surexprimé dans ces tumeurs. Le gène codant pour la protéine NPM est muté dans un tiers des LAM provoquant sa translocation dans le cytoplasme et la perte de sa capacité à restreindre la localisation d'ARF dans le nucléole¹⁹⁶. Ainsi, la surexpression de TRIP12 et la perte de localisation nucléolaire d'ARF compromettent fortement l'activation de la voie ARF/p53 dans les cellules issues de LAM. En effet, dans une autre étude, il a été démontré que le niveau d'expression de p53 et d'ARF est très faible dans des cellules de LAM mutées sur le gène NPM¹⁹⁷. Comme attendu, ARF est très instable et vite dégradé par le protéasome. Néanmoins, induire une perte d'expression de TRIP12 stabilise ARF et permet de réactiver la voie p53 dans ces cellules.

Un séquençage à large échelle des ARNs des cellules sanguines mononucléées périphériques issues de patients atteints de LAM et en rémission complète montre un saut de l'exon 3 du gène *Trip12* chez les patients en rémission complète¹⁹⁸. Les auteurs en concluent que l'épissage alternatif de l'ARNm de *Trip12* pourrait interrompre la polyubiquitination de la protéine ARF et donc empêcher sa dégradation. Cela permettrait une activation de la voie de signalisation ARF/p53 et une induction de l'apoptose de cellules ayant une croissance aberrante. Ce processus peut contribuer à la rémission de cette maladie et positionne la protéine TRIP12 comme une cible thérapeutique potentielle. De plus, ces données associées à l'étude précédente sont en faveur de l'utilisation de TRIP12 en tant que marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie.

II.4.b.2.b Dans le cancer hépatique

Il a été démontré que la déubiquitinase USP7 est surexprimée dans le cancer hépatique par rapport au tissu non cancéreux¹⁹⁹. Cette surexpression est associée à une surexpression de la protéine TRIP12. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ce cancer ne sont pas complètement définis, ce qui en fait un cancer au pronostic sombre. La surexpression de la protéine USP7 accélère la prolifération des cellules cancéreuses hépatiques par l'intermédiaire d'un complexe formé avec TRIP12. En formant ce complexe,

USP7 stabilise TRIP12 qui en retour polyubiquitine ARF. La dégradation d'ARF favorise la progression tumorale en empêchant l'activation de la voie p53. Cette étude démontre que la surexpression de la protéine TRIP12 dans le cancer hépatique est un marqueur de mauvais pronostic.

II.4.b.2.c Dans le cancer gastrique

L'infection par *Helicobacter pylori* est un facteur de haut risque pour le développement d'un cancer gastrique²⁰⁰. De manière intéressante, TRIP12 est surexprimée uniquement dans les cancers gastriques infectés par la bactérie *H. pylori*. L'induction de la protéine TRIP12 par cette bactérie est due au facteur de virulence bactériale CagA (*Cytotoxin-Associated Gene A*) par un mécanisme encore méconnu. La surexpression de TRIP12 favorise l'initiation et la progression tumorale en provoquant la polyubiquitination de la protéine ARF et l'inhibition de l'autophagie dépendante de p53 dans les cellules infectées.

II.4.c Les rôles de la protéine TRIP12 dans la réponse aux dommages à l'ADN

II.4.c.1 Par la voie ARF/p53

La voie ARF/p53 joue un rôle important dans la régulation des dommages à l'ADN. La surexpression de la protéine c-Myc bloque la dégradation d'ARF, provoque une accumulation de p53 et engendre une réponse apoptotique après induction de dommages à l'ADN¹⁹⁶. Lors d'une faible expression de c-Myc, ARF est dégradé après polyubiquitination par TRIP12, la voie p53 est activée et le cycle cellulaire est arrêté en réponse aux dommages à l'ADN. Ces résultats apportent un nouvel aspect de la régulation de la voie ARF/p53 en réponse à des dommages à l'ADN. La modulation de la stabilité d'ARF affecte clairement le type de réponse dépendant de p53. Les mécanismes régulant l'ubiquitination d'ARF par TRIP12 en réponse à des dommages à l'ADN sont très importants et méritent d'être plus explorés. Pour rappel, une étude a identifié l'acide aminé de TRIP12 phosphorylé par les kinases ATM/ATR¹⁸⁹. Il est possible que TRIP12 soit phosphorylée par ces deux kinases lors de dommages à l'ADN pour moduler son interaction avec c-Myc et la polyubiquitination de la protéine ARF.

II.4.c.2 Par le contrôle de l'ubiquitination des histones

L'ubiquitination des histones joue un rôle important pour le recrutement de protéines essentielles dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN. L'E3 ubiquitine ligase RNF8 initie l'ubiquitination des histones H2A et H2AX au niveau du dommage²⁰¹. Cet amorçage de la réaction d'ubiquitination est amplifié par RNF168, une autre E3 ubiquitine

ligase. La chaîne de polyubiquitination K63 produite sert de plateforme d'interaction pour les facteurs de signalisation de la réparation, tels que 53BP1 et le complexe RAP80/BRCA1²⁰².

Hormis les effets positifs sur la stabilité du génome, RNF168 peut être une potentielle menace pour le génome. En effet, une fois recrutée au niveau du dommage, RNF168 peut amplifier le signal d'ubiquitination au-delà de la cassure, c'est-à-dire au niveau de l'ADN non endommagé. Une amplification non contrôlée de l'ubiquitination sur des histones peut avoir des conséquences délétères, notamment en séquestrant les gardiens du génome 53BP1 et BRCA1 dont le recrutement dépend de l'ubiquitination des histones. La rétention de 53BP1 et de BRCA1 au niveau de l'ADN non endommagé empêcherait leur recrutement au niveau des cassures de l'ADN et affecterait leur réparation.

Une étude démontre qu'après dommages à l'ADN une amplification excessive de l'ubiquitination des histones peut avoir lieu et jouer un rôle sur la dynamique de la voie de réparation des dommages double brin de l'ADN²⁰³. TRIP12 et UBR5 ont été identifiées comme deux protéines inhibitrices de cette amplification. Dans des conditions physiologiques, TRIP12 et UBR5 déterminent la quantité de RNF168 nécessaire pour restreindre l'ubiquitination des histones autour de la lésion. L'absence de TRIP12 et d'UBR5 provoque une accumulation de RNF168 à des niveaux supra physiologiques qui amplifie l'ubiquitination des histones au-delà du site de cassure. De plus, TRIP12 a été identifiée comme l'E3 ubiquitine ligase responsable de la polyubiquitination et de la dégradation de RNF168. TRIP12 contrôle la quantité de RNF168 nucléaire dans le but d'éviter une ubiquitination excessive de la chromatine.

Cette même étude met en évidence une amplification des foyers 53BP1 et de très hauts niveaux d'expression de la protéine RNF168 dans 50% des tumeurs infectées par le virus HPV, contrairement aux tumeurs non infectées. Plus récemment, des travaux ont permis de détailler le mécanisme d'induction de RNF168 dans ces tumeurs où TRIP12 est négativement régulée par le « suppresseur de tumeurs » p16, un marqueur d'infection par le papillomavirus humain²⁰⁴. Dans les cas de carcinomes de la tête et du cou infectés par le papillomavirus humain, la surexpression de p16 induit une perte d'expression de TRIP12. En réponse, une surexpression de RNF168 est observée. La surexpression de RNF168 provoque une augmentation du nombre et de la taille des foyers 53BP1 par une ubiquitination non contrôlée des histones. Vingt-quatre heures après irradiation, une persistance des foyers 53BP1 représentative d'une inhibition de la réparation des dommages à l'ADN et d'une bonne réponse à la radiothérapie est observée. L'inhibition de l'expression de TRIP12 est associée à une sensibilisation à la radiothérapie dans les carcinomes de la tête et du cou positifs pour le papillomavirus humain. La protéine TRIP12 pourrait donc être un marqueur de prédiction de réponse à la radiothérapie dans les carcinomes de la tête et du cou.

II.4.c.3 Par la déubiquitinase USP7

La déubiquitinase USP7 joue un rôle majeur dans la réponse aux dommages à l'ADN en contrôlant le niveau d'expression de protéines clés, telles que p53 et RNF168^{205,206}. Cependant, la régulation d'USP7 n'est pas complètement connue. Une étude a mis en évidence que TRIP12 interagit avec USP7 et la polyubiquitine (chaîne K48) pour induire sa dégradation par le protéasome²⁰⁷. Parallèlement, la stabilisation de TRIP12 par USP7 a été décrite dans le cancer hépatique¹⁹⁹. USP7 et TRIP12 sont ainsi des cibles réciproques et possèdent également une cible commune, l'E3 ubiquitine ligase RNF168. La balance entre TRIP12 et USP7 peut déterminer le devenir de cette protéine, notamment dans la réponse aux dommages à l'ADN. Il est connu qu'après dommages à l'ADN, USP7 se lie à RNF168 et la déubiquitine dans le but d'éviter sa dégradation par le protéasome. Au contraire, TRIP12 polyubiquitine RNF168. Pour éviter une amplification anormale de l'ubiquitination sur la chromatine, il est possible que TRIP12 initie la déstabilisation de RNF168 en polyubiquitinant dans un premier temps USP7 puis polyubiquitine RNF168 dans un deuxième temps pour induire sa dégradation par le protéasome.

II.4.d Les rôles de TRIP12 dans le remodelage de la chromatine

II.4.d.1 Par le contrôle de l'intégrité du complexe SWI/SNF

L'ADN est empaqueté et compacté dans une structure nommée la chromatine constituée des histones et de l'ADN pour réguler des processus très dynamiques telles que la transcription, la réplication, la réparation et la recombinaison de l'ADN. Lorsque la chromatine est compactée, les gènes sont souvent inactifs car la machinerie transcriptionnelle accède moins facilement aux promoteurs²⁰⁸. La modification de la compaction de la chromatine et par conséquent l'activation des gènes est en partie contrôlée par le complexe SWI (*Switch mutants*)/SNF (*Sucrose Non-Fermenting*) dont le but est de décondenser l'ADN qui est finement enroulé autour des histones²⁰⁹. Le complexe SWI/SNF est un complexe multi-protéique composé d'une douzaine de sous-unités. Les sous-unités Brg-1 ou Brm1 portent l'activité catalytique. Elles utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour exposer les promoteurs de gènes à la machinerie transcriptionnelle, activer la transcription et ainsi contrôler une multitude de processus cellulaires²¹⁰. Pour obtenir une activation complète, le complexe SWI/SNF nécessite la présence de protéines BAFs (*Brg-1 associated factors*) qui interagissent avec Brg-1. Le niveau d'expression des protéines BAFs est contrôlé par une dégradation dépendante du protéasome.

Il a été démontré que TRIP12 est l'E3 ubiquitine ligase principale qui régule la quantité de BAF57²¹¹. Lorsque BAF57 n'est pas complexée au complexe SWI/SNF, elle est dégradée par le protéasome après polyubiquitination par TRIP12. L'interaction de BAF57 avec BAF155 empêche son interaction avec TRIP12 et masque les lysines ciblées par l'ubiquitination (**Figure 29**). La dégradation d'une protéine libre due à la polyubiquitination par TRIP12 a déjà été décrite. En effet, TRIP12 interagit et provoque la dégradation d'APP-BP1 (*Amyloid Precursor Protein-Binding Protein 1*), une protéine impliquée dans la voie d'activation de la protéine NEDD8 uniquement lorsque celle-ci est sous sa forme monomérique¹⁸⁴. L'hétérodimérisation d'APP-BP1 avec la protéine Uba3 empêche la polyubiquitination par TRIP12.

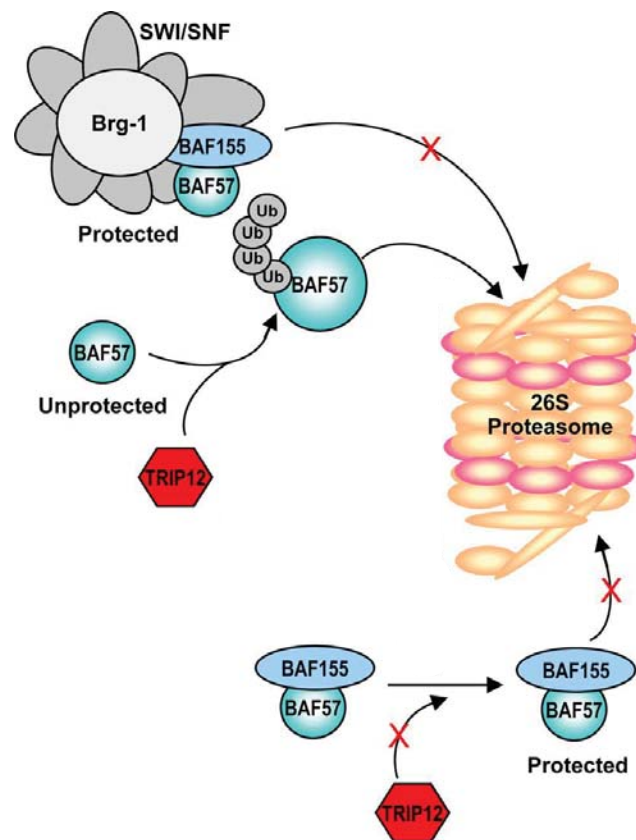


Figure 29 : Modèle illustrant la relation BAF155-BAF57-TRIP12 (adaptée de *Keppler et al. 2010*²¹¹).

Lorsque BAF57 est dans le complexe SWI/SNF ou simplement liée à BAF155, la protéine est protégée de l'ubiquitination. Au contraire, la forme libre de BAF57 est susceptible d'être dégradée après polyubiquitination par TRIP12.

Le complexe SWI/SNF joue un rôle essentiel dans la régulation et la fidélité transcriptionnelle d'acteurs majeurs de processus cellulaires tels que la mitose, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la carcinogénèse²¹². Par exemple, le complexe SWI/SNF permet l'activation de gènes ciblés par le facteur de transcription c-myc ou au contraire peut inhiber la transcription de certains gènes, notamment ceux de *c-fos* et de la *cycline E*. Etant donné le rôle de TRIP12 dans le contrôle de l'intégrité du complexe SWI/SNF, une dérégulation de son

expression et/ou de son activité peut avoir de lourdes conséquences sur ces différents processus. C'est probablement le cas lors du développement embryonnaire de la souris. En effet, une mutation homozygote inactivant l'activité catalytique de TRIP12 entraîne la létalité précoce des embryons au stade embryonnaire 11.5²¹³. Cette étude démontre que les cellules ES issues de ces embryons ont une dérégulation globale de l'expression de gènes due à une surexpression de BAF57.

II.4.d.2 Par la préservation de gènes mis sous silence par le complexe Polycomb

Les modifications épigénétiques (méthylations et acétylations) des bases de l'ADN jouent un rôle dans le contrôle de la transcription des gènes. La plupart de ces modifications ont d'abord été identifiées chez les Procaryotes puis chez les Eucaryotes supérieurs.

La méthylation sur l'azote en position 6 de l'adénine (6mA) est la modification la plus fréquente chez les Procaryotes. Elle a récemment été décrite chez les Eucaryotes dont les Vertébrés²¹⁴. Chez les Mammifères, la méthyltransférase *Mettl4* et la dioxygénase *Alkbh4* sont respectivement responsables du dépôt et de la suppression de la 6mA sur l'ADN²¹⁵. Chez les mammifères, la 6mA est associée à des marques épigénétiques répressives telles que la monoubiquitination sur la lysine 119 de l'histone H2A (H2A-K119ub) et la triméthylation sur la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Ces marques répressives servent à la mise sous silence de promoteurs de gènes au cours de la différenciation des cellules souches et du développement embryonnaire. Elles sont déposées sur la chromatine principalement par les complexes répressifs Polycomb (PRC1 et PRC2)^{216,217}. Ces deux marques sont réversibles. La monoubiquitination de l'histone H2A est enlevée par le complexe de débubiquitinase PR-DUB composé des protéines *ASXL1* (*Additional Sex Combs Like 1*) et *BAP1* (*BRCA1 Associated Protein 1*)²¹⁸. La protéine BAP1 porte l'activité débubiquitinase et est stabilisée par *ASXL1*²¹⁹.

Une étude a caractérisé le rôle du dépôt de la 6mA et de l'intervention de l'E3 ubiquitine ligase TRIP12 dans la préservation des marques répressives déposées par le complexe Polycomb (**Figure 30**)²¹⁵. En effet, le dépôt de 6mA au niveau de gènes inactivés par PRC1 et PRC2 permet le recrutement du complexe PR-DUB. Ce recrutement au niveau de la chromatine entraîne la dégradation de ce complexe après polyubiquitination d'*ASXL1* par TRIP12 et préserve le niveau d'H2A-K119ub.

Une mutation homozygote du gène *Mettl4* chez la souris a été réalisée dans cette étude. Cette mutation induit une diminution du dépôt de 6mA et provoque un retard du développement facial de la souris. De plus, des mutations « gain de fonction » du gène *Asx1*

ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome de Bohring-Opitz, lesquels présentent une dysmorphie faciale²²⁰. De manière intéressante, chez l'Homme des mutations du gène *Triip12* sont également associées avec des dysmorphies faciales (§ partie II.5)²²¹. Une inactivation de TRIP12 pourrait provoquer une accumulation d'ASXL1 et ainsi une stabilisation du complexe PR-DUB avec pour conséquences une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans le développement de la face.

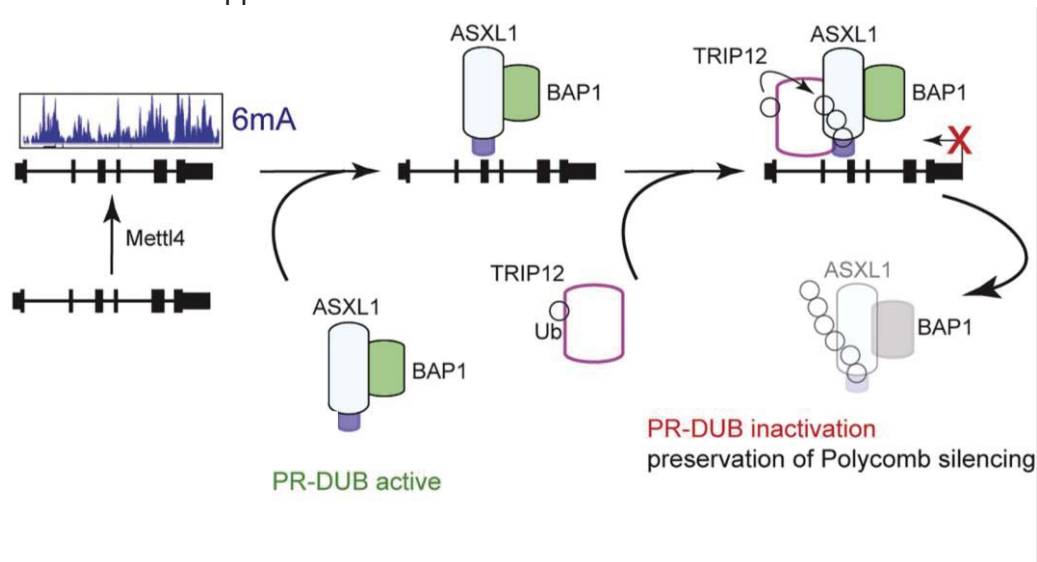


Figure 30 : Modèle d'induction de la dégradation d'ASXL1 par TRIP12 (adaptée de S. Kweon et al. 2019²¹⁵).

Le dépôt de 6mA par Mettl4 recrute ASXL1/BAP1 et engage la dégradation d'ASXL1 par l'E3 ubiquitine ligase TRIP12, inactivant le complexe PR-DUB et préservant ainsi la marque répressive qui avait été déposée par le complexe Polycomb sur la chromatine.

La dérégulation globale de l'expression de gènes observée dans les embryons de souris mutées pour le gène *Triip12* pourrait également être expliquée par ce mécanisme²¹³. Les embryons de souris exprimant la protéine TRIP12 inactive présentent un retard de développement dès le stade embryonnaire 8.5 alors que la létalité intervient au stade embryonnaire 11.5. Il semblerait que la protéine TRIP12 soit essentielle au bon développement neuronal et cérébral de la souris. De plus, une diminution du nombre de somites est observée au stade embryonnaire 9.5 pour les embryons mutants. Le facteur de transcription Sox6 essentiel pour l'homéostasie des cellules musculaires est exprimé dans les somites pendant le développement embryonnaire. TRIP12 a été identifiée comme l'E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de ce facteur de transcription²²². Une surexpression de Sox6 pendant le développement des embryons mutants pourrait être à l'origine du phénotype observé.

L'ensemble des cibles identifiées de TRIP12 exerce des fonctions cellulaires importantes dans la réponse aux dommages à l'ADN, le remodelage de la chromatine et la voie de signalisation p53. Ces processus finement régulés au cours du cycle cellulaire et très

proches de la chromatine suggèrent une localisation de TRIP12 proche de la chromatine et dépendante du cycle cellulaire.

II.5 Les altérations du gène *Trip12*

II.5.a Les altérations du gène *Trip12* dans la déficience intellectuelle et l'autisme

Les variations du nombre de copies de la région chromosomique 2q36.3 sur laquelle se trouve le gène *Trip12* sont rares. Avant cette décennie, seule une délétion d'environ 5.4 Mb sur le chromosome 2q36.3 a été reportée (**Tableau 3**). La perte de cette région a été retrouvée chez un patient atteint de multiples kystes rénaux, de problèmes de développement du visage et d'une déficience intellectuelle²²³.

L'identification de nouveaux gènes associés à une déficience intellectuelle et à l'autisme a fait l'objet d'intenses recherches. L'analyse de données issues du séquençage à haut débit obtenu à partir d'ADN de cohortes de patients atteints de trouble du spectre de l'autisme, a révélé 64 nouveaux gènes à risque dont fait partie le gène *Trip12*²²⁴. Dans cette étude, quatre mutations *de novo* du gène *Trip12* ont été identifiées, répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**). Deux mutations non-sens dans l'exon 5 (c.1012C>T (p.R338X) et c.1054C>T (p.R352X)) aboutissent à la formation d'une protéine TRIP12 tronquée sans domaine catalytique. Tandis que deux mutations faux sens dans les exons 33 (c.4784G>A (p.R1595Q)) et 38 (c.5519C>T (p.S1840L)) modifient les acides aminés du domaine catalytique. Ces patients présentent non seulement un trouble du spectre de l'autisme mais aussi un handicap mental. Plus récemment, deux autres mutations du gène *Trip12* aboutissant à la formation d'une protéine tronquée sans domaine catalytique ont été identifiées dans une méta-analyse de 2104 trios de parents-patient. Les quatre patients porteurs de ces mutations (c.460_461delAG et c.5746C>T (p.Q1916X)) sont atteints de déficience intellectuelle (**Tableau 3**)²²⁵. Cette étude a permis de proposer TRIP12 comme un gène candidat dans l'apparition de ce trouble.

Bramswing et al. se sont demandés si les mutations du gène *Trip12* pouvaient être associées à un trouble du spectre de l'autisme en plus des déficiences intellectuelles²²¹. Dans cette étude, deux nouveaux sites d'épissage, une mutation non-sens, trois mutations faux sens et une translocation du chromosome 2 et X dans l'intron 1 de *Trip12* ont été identifiés, en plus des mutations déjà publiées (**Tableau 3**). Pour résumer, une mutation ou une perte du gène *Trip12* pourrait être impliquée dans l'apparition de déficiences intellectuelles avec ou sans

trouble du spectre de l'autisme. De plus, tous les individus porteurs d'une mutation du gène *Trip12* présentent une dysmorphie faciale et dans certains cas des retards moteurs et des troubles du langage.

Neuf autres individus ayant des mutations hétérozygotes du gène *Trip12* et des troubles intellectuels, du développement du visage et du spectre de l'autisme ont été identifiés (**Tableau 3**)²²⁶. Cependant ces mutations sont retrouvées chez seulement 0,01% et 0,06% des 60 000 et 7200 patients testés avec des problèmes neurologiques.

L'ensemble de ces études suggère un rôle de la protéine TRIP12 dans le développement du système nerveux et son fonctionnement. Il semble que l'haploinsuffisance du gène *Trip12* au début de l'enfance est un facteur de risque dans l'apparition de problèmes neurodéveloppementaux, même si la plupart des mutations retrouvées affecte un faible pourcentage de patients.

Nom de la mutation	Exon	Mutation	Pathologies				Ref.
			D.I	S.A	D.F	Autres	
Délétion	1-41	Del (2) (q36.2q36.3)	✓	X	✓	Kystes rénaux	223
Délétion	1-4	4 exons	✓	X	✓	Retard du langage et moteur	226
Faux sens	2	c.14C>T (p.P5L)	✓	✓	✓		221
Délétion	2-5	4 exons	✓	X	✓		226
Délétion	3	c.460_461delAG	✓	✓	✓		225,221
Non-sens	5	c.1012C>T (p.R338X)	✓	✓	✓		221,224
Non-sens	5	c.1054C>T (p.R352X)	✓	X	✓		221
Faux sens	16	c.2282C>T (p.A761V)	✓	✓	✓	Obésité, retard du langage et moteur	221,226
Insertion	20	c.2979dupA	✓	✓	✓	Obésité, retard du langage et moteur	226
Délétion	20	c.2981+1delG	✓	✓	✓		224
Délétion	24	c.3446_3447delCA	✓	✓	✓	Retard du langage et moteur	226
Faux sens	32	c.4768G>C (p.N1590H)	✓	X	✓		221
Délétion	25-41	17 exons	✓	X	✓	Retard du langage	226
Délétion	30-38	9 exons	✓	✓	✓	Obésité morbide, retard du langage et moteur	226
Faux sens	33	c.4784G>A (p.R1595Q)	✓	✓	✓		221,224
Faux sens	38	c.5519C>T (p.S1840L)	✓	✓	✓		221,224
Non-sens	40	c.5746C>T (p.Q1916X)	✓	X	✓		225
Variant d'épissage (délétion)	Saut de l'exon 6	c.1145-2A>C	✓	✓	✓		226

Variant d'épissage (insertion)	Saut de l'exon 17	c.2524+3dupA	✓	✓	✓		221
Variant d'épissage (insertion)	Saut de l'exon 22	c.3356+1G>A	✓	✓	✓		221
Variant d'épissage (insertion)	Saut de l'exon 25	c.3743+1G>A	✓	X	✓	Retard du langage et moteur	226

Tableau 3 : Mutations du gène *Trip12* et pathologies associées.

D.I : Déficiences intellectuelles, S.A : Spectre de l'autisme, D.F : Dysmorphie faciale.

II.5.b Les mutations du gène *Trip12* dans les cancers

Plus d'altérations du gène *Trip12* ont été identifiées chez les patients atteints de cancers (**Tableau 4**) par rapport à ceux atteints de déficience intellectuelle et d'autisme.

Les carcinomes gastriques et colorectaux présentent de l'instabilité micro satellitaire, c'est-à-dire des erreurs d'appariement de base au niveau de petites séquences d'ADN répétées et non codantes. Ces types de cancers possèdent également des mutations du cadre de lecture de gènes contenant des répétitions de mononucléotides. Le gène *Trip12* contient respectivement sept répétitions d'adénine et de thymidine dans les exons 3 et 24, respectivement. Une étude démontre que 3,7% et 3,1% des cancers gastriques et colorectaux sont mutés dans ces séquences répétées du gène *Trip12*²²⁷. Une insertion d'une adénine dans l'exon 3 et une délétion d'une thymidine dans l'exon 24 ont été observées (**Tableau 4**). Ces mutations ont pour conséquence la formation d'une protéine TRIP12 tronquée qui ne possède pas d'activité catalytique.

Une seconde étude a voulu identifier les gènes impliqués dans l'apparition du cancer du sein chez les femmes ménopausées après une hormonothérapie ménopausique. Cette étude montre qu'une mutation dans la région intronique située entre les exons 1 et 2 du gène *Trip12* est associée avec un risque de développement d'un cancer du sein (**Tableau 4**)²²⁸.

Un autre groupe a analysé le niveau d'expression d'ARNs (RNAseq) issus de 12 adénocarcinomes du poumon dans le but d'identifier des mutations somatiques. Parmi les 118 gènes mutés identifiés la mutation faux-sens dans l'exon 16 du gène *Trip12* est la plus fréquente (9/12) (**Tableau 4**).²²⁹ Le cancer du poumon est l'un des cancers les plus fréquents avec une forte incidence et une très forte mortalité dans le monde en raison de l'absence de marqueurs de diagnostic précoce. La découverte d'une mutation fréquente de TRIP12 dans l'adénocarcinome du poumon pourrait être utilisée en tant que marqueur diagnostique de ce cancer. Cependant, cette étude contient seulement 12 cas et nécessiterait un nombre

d'échantillon plus grand pour confirmer que cette mutation est vraiment présente dans 75% des cas.

Enfin, des travaux récemment publiés identifient des gènes mutés dans les carcinomes anaux positifs pour le papillomavirus humain²³⁰. Un séquençage à haut débit de l'ADN issu de vingt tumeurs a été réalisé. Quinze pour cent de ces cancers (3/20) sont mutés pour le gène *Trip12*. Trois nouvelles mutations bi-alléliques du gène *Trip12* ont été identifiées, une dans l'exon 3 et deux dans les exons 33 et 37 codant pour le domaine catalytique HECT de TRIP12 (**Tableau 4**).

Nom de la mutation	Exon	Mutation	Cancer associé	Ref.
Substitution	Intron entre exon 1 et 2	g.230467943 C>A	Cancer du sein	228
Insertion	3	c.273InsA (p.P92TfsX8)	Adénocarcinome gastrique à instabilité micro satellitaire	227
Faux sens	3	c.592C>T (p.S197F)	Carcinomes anaux	230
Faux sens	16	g.230670518 G>C	Adénocarcinome du poumon	229
Délétion	24	c.3583delT (p.S1195LfsX24)	Adénocarcinome colorectal à instabilité micro satellitaire	227
Non-sens	33	c.4783C>T (p.R1595X)	Carcinomes anaux	230
Délétion	37	c.5462_5469del	Carcinomes anaux	230

Tableau 4 : Mutations du gène *Trip12* et cancers associés.

Finalement, peu de publications décrivent des mutations du gène *Trip12* retrouvées dans le cancer. Le nombre de cas étudiés est souvent insuffisant pour en tirer des conclusions définitives. Cependant, la base de données cBioPortal référence les mutations et les CNA (*Copy Number Alteration*) de gènes dans un très grand nombre de cas de cancers. La **Figure 31** décrit la fréquence d'apparition de mutation et de CNA du gène *Trip12* dans les cancers à partir d'études non redondantes et comptant plus de 100 cas. En moyenne, le gène *Trip12* est retrouvé altéré dans 1,4% des cancers (sur 21845 patients). Ce taux reste relativement faible par rapport à celui observé pour le gène *TP53* qui est de 39,8%. Des altérations du gène *Trip12* sont retrouvées dans une multitude de cancers notamment dans 12,4% des cancers utérins et 0,21% des cancers de la thyroïde.

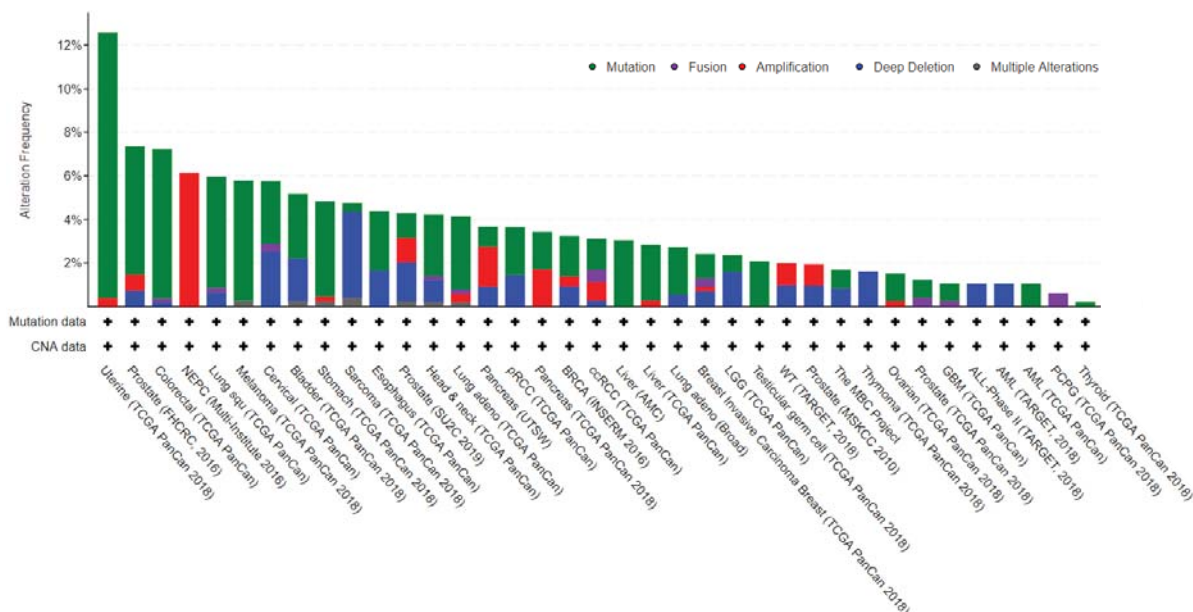


Figure 31 : Fréquence d'altération du gène *Trip12* dans les cancers (de *cBioPortal*).
 NEPC : Neuroendocrine Prostate Cancer, pRCC : Pathology of Renal Cell Carcinoma, BRCA : Breast Cancer, ccRCC : Clear Cell Renal Cell Carcinoma, LGG : Lower Grade Glioma, WT : Wilms' Tumor, MBC : Metastatic Breast Cancer, GBM : Glioblastoma, ALL : Acute Lymphoblastic Leukaemia, AML : Acute Myeloid Leukemia, PCPG : Pheochromocytoma and Paranganglioma.

397 mutations ponctuelles du gène *Trip12* sont répertoriées et annotées sur la séquence protéique de TRIP12 de la **Figure 32**. Ces mutations ne s'accumulent pas à un seul endroit de la séquence du gène *Trip12* mais sont localisées tout le long de la protéine. Parmi ces mutations 288 sont faux-sens, 108 induisent une protéine tronquée et une provient d'une insertion nucléotidique sans décalage du cadre de lecture. De plus, 19 altérations du gène *Trip12* correspondent à une fusion entre chromosomes. Aucun point chaud ou « hotspot » de mutations n'a pu être identifié. Une mutation non-sens est toutefois retrouvée 10 fois au niveau de l'acide aminé S1195 : 6 fois dans le cancer du côlon, 2 fois dans le cancer utérin et une fois dans les cancers du poumon et du sein.

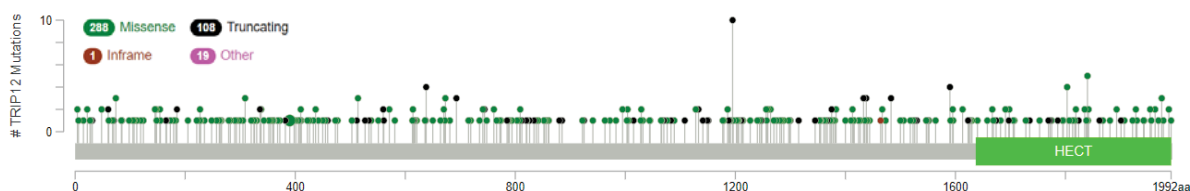


Figure 32 : Annotation des mutations de TRIP12 sur sa séquence protéique (de *cBioPortal*).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Introduction générale : Rationnel de thèse

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse consacre ses efforts de recherche depuis de nombreuses années à la compréhension des mécanismes moléculaires responsable de l'hétérogénéité du cancer du pancréas. L'équipe a identifié TRIP12 comme partenaire et E3 ubiquitine ligase responsable de l'induction de la dégradation du facteur de transcription PTF1a¹⁸¹. PTF1a est une protéine essentielle pour le développement du pancréas et le maintien du phénotype pancréatique acinaire^{231,232}. Considéré comme un « suppresseur de tumeurs », PTF1a disparaît au cours de l'initiation du cancer du pancréas et serait capable de re-différencier des lésions tumorales en cellules acinaires^{190,233}. Mon équipe a mis en évidence une hétérogénéité d'expression de TRIP12 entre des tumeurs pancréatiques provenant de différents patients (données non publiées). Pour expliquer cette différence d'expression, différentes lignées issues de patients atteints de cancer du pancréas et mimant l'hétérogénéité observée chez les patients ont été utilisées. Des différences d'expression d'ARNm de TRIP12 ont été mesurées dans les différentes lignées expliquant partiellement les différents niveaux protéiques de TRIP12. Les recherches menées ont révélé que la proportion de cellules asynchrones exprimant TRIP12 est différente d'une lignée à l'autre. Ces résultats ont suggéré une régulation de l'expression protéique de TRIP12 au cours du cycle cellulaire. Au moment de ces découvertes, il n'existait seulement que 21 publications sur TRIP12 et aucune d'entre elles n'avaient étudié la régulation de TRIP12.

Les objectifs de ma thèse étaient :

- **De comprendre la régulation de TRIP12 au cours du cycle cellulaire.**
- **De déterminer les étapes du cycle cellulaire dans lesquelles TRIP12 exerce ses fonctions.**

II. Publication en cours

II.1 « TRIP12 regulates mitotic entry and chromosome stability »

TITLE: The E3 ubiquitin ligase TRIP12 is cell cycle regulated to participate in mitotic entry and chromosome stability.

CONDENSED TITLE: TRIP12 regulates mitotic entry and chromosome stability.

LIST OF AUTHORS: Larrieu D¹, Brunet M¹, Hanoun N¹, Ligat L¹, Dagnon L¹, Lulka H¹, Pommier R², Selves J¹, Jádý BE³, Bartholin L², Cordelier P¹, Dufresne M¹ and Torrisani J.¹

CORRESPONDING AUTHOR: Jérôme Torrisani (jerome.torrisani@inserm.fr)

ORCID Number: [0000-0001-6880-9357](https://orcid.org/0000-0001-6880-9357)

AFFILIATIONS.

¹ Université de Toulouse, INSERM, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France.

² Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, 69008, France.

³ Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote du CNRS, UMR5099, Centre de Biologie Intégrative, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse Cedex 9, France.

SUMMARY.

TRIP12 is regulated during the cell cycle and binds euchromatin. It participates in mitotic entry by controlling the S phase duration and is necessary for mitotic progression and chromosome stability.

ABSTRACT.

Several studies have linked the E3 ubiquitin ligase TRIP12 (Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12) to the cell cycle. However, the regulation and the functions of this protein during the cell cycle are largely unknown. In this study, we show that the E3 ubiquitin ligase TRIP12 expression is regulated during the cell cycle, which correlates with its nuclear localization. We identify an euchromatin-binding function of TRIP12 mediated by a N-terminal intrinsically disordered region. We demonstrate the functional implication of TRIP12 in the mitotic entry by controlling the duration of DNA replication that is independent from its catalytic activity. We also show the requirement of TRIP12 in the mitotic progression and chromosome stability. Altogether, our findings show that TRIP12 is as a new chromatin-associated protein with essential functions in cell cycle progression and in the maintenance of genome integrity.

KEYWORDS: E3 ubiquitin ligase, DNA binding, mitosis, chromosome stability, mitosis entry.

INTRODUCTION.

TRIP12 (Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein 12) is a 225 kDa HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) domain-containing E3 ubiquitin ligase. TRIP12 contains protein interacting WWE (tryptophan and glutamate conserved residues) and β -ARM (β -Armadillo) domains (Ju et al., 2007). Several functions are attributed to TRIP12. For instance, it ubiquitinates APP-BP1 (Amyloid Precursor Protein-Binding Protein 1) and BAF57 (Brg1-Associated Factor 57) turn over and is therefore described as a sensor of SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) complex integrity (Keppler and Archer, 2010; Park et al., 2008). TRIP12 is also known to control the histone ubiquitination after DNA breakage (Gudjonsson et al., 2012) and to contribute to p14/ARF(Alternate Reading Frame) degradation in response to DNA damage (Chen et al., 2013). TRIP12 ensures the proteolysis of ASLX1 (Additional Sex Combs Like 1, Transcriptional Regulator), a regulatory component of the ubiquitin hydrolase BAP1 (BRCA1 Associated Protein 1) (Kweon et al., 2019) We showed that TRIP12 is implicated in the proteasome-mediated degradation of the transcription factor PTF1a (Pancreas specific Transcription Factor 1a) that plays an important role in the maintenance of the acinar phenotype in human pancreas (Hanoun et al., 2014). TRIP12 is essential for cell viability as a homozygous mutation that disrupts the ubiquitin ligase activity leads to murine embryonic lethality (Kajiro et al., 2011). Importantly, TRIP12 plays an important role in cell cycle. For instance, ^{Tripl12 mt/mt} ES cells display a reduced growth with an increased expression of p16/CDKN2A gene and an accumulation in G₂/M phase (Kajiro et al., 2011). Moreover, by controlling the tumor suppressor protein p14/ARF, TRIP12 impacts TP53 protein level, a major regulator of the cell cycle (Chen et al., 2010). TRIP12 expression is altered in several types of cancer, such as breast and pancreatic cancer (Chen et al., 2010). High expression of TRIP12 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma after surgical resection (Cai et al., 2015). TRIP12 is involved in radio-sensitization of head and neck squamous carcinoma (Wang et al., 2017). TRIP12 mutations are also related to autism disorder (O’Roak et al., 2014) and intellectual disability (Bramswig et al., 2017).

Cell cycle progression is governed by sequentially organized events. Mitogen signaling pathways impose to the cell the exit of G₁ phase to duplicate its genome. The licensing of replication origins is controlled by the loading of ORC (origin recognition complex) followed by MCM helicases (Minute Chromosome Maintenance) to form the pre-replication complex (pre-RC). In S phase, the origins firing is dependent of the assembly of other proteins and the activity of CDKs (Cyclin Dependent Kinase). A multitude of additional factors are the recruited such as RPA (replication protein A), PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and polymerases to constitute the fully functional replisome (Siddiqui et al., 2013). DNA replication is spatio-temporally ordered. Replication of euchromatin regions occurs in early S phase whereas heterochromatin regions in late S phase (Lau and Arrighi, 1981). Subsequently, cells enter in a transition phase G₂ that ensures the complete DNA replication. In late G₂ phase, the initiation of mitosis is promoted by a complex formed by the Cyclin B1 and the Cyclin-Dependent Kinase 1 (CDK1) (Dunphy et al., 1988). This complex is inhibited by phosphorylation of Tyrosine 15 residue on CDK1 by the WEE1 kinase (Parker and Piwnicka-Worms, 1992). Chromatin condensation, separation of duplicated centrosomes, and the recruitment of proteins to the kinetochores, all mark the prophase. The resulting release of chromosomes activates the Spindle Assembly Checkpoint (SAC) that controls the proper segregation of chromosomes and inhibits the Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) complex. In metaphase, the correct attachment of chromosomes to the kinetochores inhibits the SAC allowing for progression and ending of mitosis (McLean et al., 2011; Musacchio and Salmon, 2007; Pesin and Orr-Weaver, 2008).

Mitotic dysfunction leads to chromosomal instability and aneuploidy favoring the initiation of cancer (Ganem and Pellman, 2012). A prolonged activation of the SAC can provoke cell death or mitotic exit without separation of sister chromatids; named mitotic slippage. Improper separation of sister chromatids (anaphase bridges) induces the formation of micronuclei, which can be at the origin of DNA damage (Crasta et al., 2012). The succession of the different cell cycle phases requires a perfectly coordinated expression and activation of multiple proteins. This coordination is ensured by a multi-layer regulation including transcription, mRNA degradation, translation, post-translation modification and protein degradation (Aviner et al., 2015). For instance, protein expression of CYCLIN A begins in S phase, peaks during G₂ phase and dramatically declines in mitosis. It combines a tight coordination of transcription, mRNA translation and protein degradation.

Among proteins that participate in cell cycle regulation, a significant proportion interacts with chromatin to modulate, for instance, the transcription (*i.e.*: transcription factors) and the chromatin structure (*i.e.*: histones, chromatin remodeling complexes, condensin). These can bind to chromatin by recognition to a specific DNA consensus sequence *via* different DNA-binding domains. (*i.e.*: β -Helix-Loop-Helix, zinc fingers) but also *via* intrinsically disordered regions (IDR). IDRs are protein domains that lack a stable 3D structure under physiological conditions. IDRs can be predicted from the amino acid sequence according to their physicochemical properties (van der Lee et al., 2014). They interact with DNA in a nucleotide sequence-independent manner, thereby modifying chromatin structure and regulating gene expression (Sabari et al., 2018).

Our findings expose for the first time that TRIP12 protein expression is tightly regulated during cell cycle, and, that TRIP12 interacts with euchromatin through a new functional N-terminal domain. By means of this chromatin interaction, we further propose that TRIP12 participates in mitotic entry by controlling duration of DNA replication. We further demonstrate that TRIP12 is implicated in mitotic progression and in chromosome stability.

RESULTS.

1- TRIP12 expression and nuclear localization are regulated during cell cycle.

The E3 ubiquitin ligase TRIP12 was shown to control the expression of important regulators of the cell cycle progression. However, the regulation of TRIP12 during the cell cycle is still unknown. To address this issue, HeLaS3 cells were arrested at the G₁/S boundary and released in the cell cycle (**Fig. 1A**). The experiment showed a maximal percentage (10.1%) of cells in early mitosis 8h after release and a maximal percentage of cells in G₁ phase (69.6%) 11h after release. The level of *Trip12* mRNA was measured and did not fluctuate during the cell cycle kinetics (**Fig. 1B**). As a control, we measured the expression of *Cyclin B1* mRNA level that is known to be up-regulated in early S phase until G₂ phase (Pines and Hunter, 1989). Similarly, *Trip12* mRNA level did not vary in G₁-, early S- and G₂-phase-enriched cell populations unlike *Cyclin B1* mRNA (**Fig. 1C and 1D**), that confirm our results (**Fig. 1B**).

Next, TRIP12 protein level was measured following the same kinetics (**Fig. 1E**). Present in S phase, TRIP12 expression gradually increases to reach a maximal expression in G₂ phase and mitosis. Interestingly, TRIP12 protein level decreased to reach a minimal expression when cells enter in G₁ phase. TRIP12 protein level was also measured in enriched cell populations in G₁, early S, and G₂ phase (**Fig. 1F**). As expected, TRIP12 protein was barely detected in G₁ phase, appears in early S phase to reach a maximal expression in G₂ phase. These results clearly demonstrate that TRIP12 protein expression varies throughout the cell cycle while its mRNA remains at a constant level and, they suggest that TRIP12 protein is degraded during G₁ phase, or *Trip12* mRNA translation is tightly regulated, or a combination of both.

We further tested whether TRIP12 cell-cycle regulation was correlated with its sub-cellular localization. We first showed that TRIP12 is a nuclear protein but it is not present in all cells (**Fig. 1G, 1H and Fig. S1A**). The specificity of TRIP12 nuclear staining was verified (**Fig. S1B**). Interestingly, TRIP12 nuclear staining did not colocalize with dense DAPI regions that correspond to peri-nuclear and perinucleolar heterochromatin regions (**Fig. 1H**), therefore suggesting that TRIP12 preferentially colocalizes with euchromatin regions. TRIP12 nuclear localization was assessed during the cycle of asynchronous HeLaS3 cells. We found that TRIP12 is barely detectable in G₁ cells and appears in early S phase cells reaching a maximal detection in late S and G₂ cells (**Fig. 1I**). TRIP12 absent cells observed in **Fig. 1H** correspond to cells in G₁. It is known that euchromatin regions are replicated early during S phase and form a homogenous staining after EDU incorporation. On the contrary, heterochromatin regions are replicated late in S phase and form a punctiform EDU staining. Interestingly, TRIP12 staining corresponds to DNA regions with homogenous EDU staining and not to the ones with punctiform staining (**Fig. 1I**), therefore confirming the localization of TRIP12 on euchromatin regions (**Fig. 1H**). Cell cycle-dependent presence of TRIP12 in the nucleus was confirmed in G₁-, early S- and G₂-phase enriched cell populations (**Fig. 1J**) and (**Fig. S1C**).

Taken together, our findings demonstrate that TRIP12 protein expression is regulated during the cell cycle by a mechanism that does not involve the regulation of its mRNA expression level. We also show that the TRIP12 expression during the cell cycle correlates with its nuclear localization on euchromatin regions.

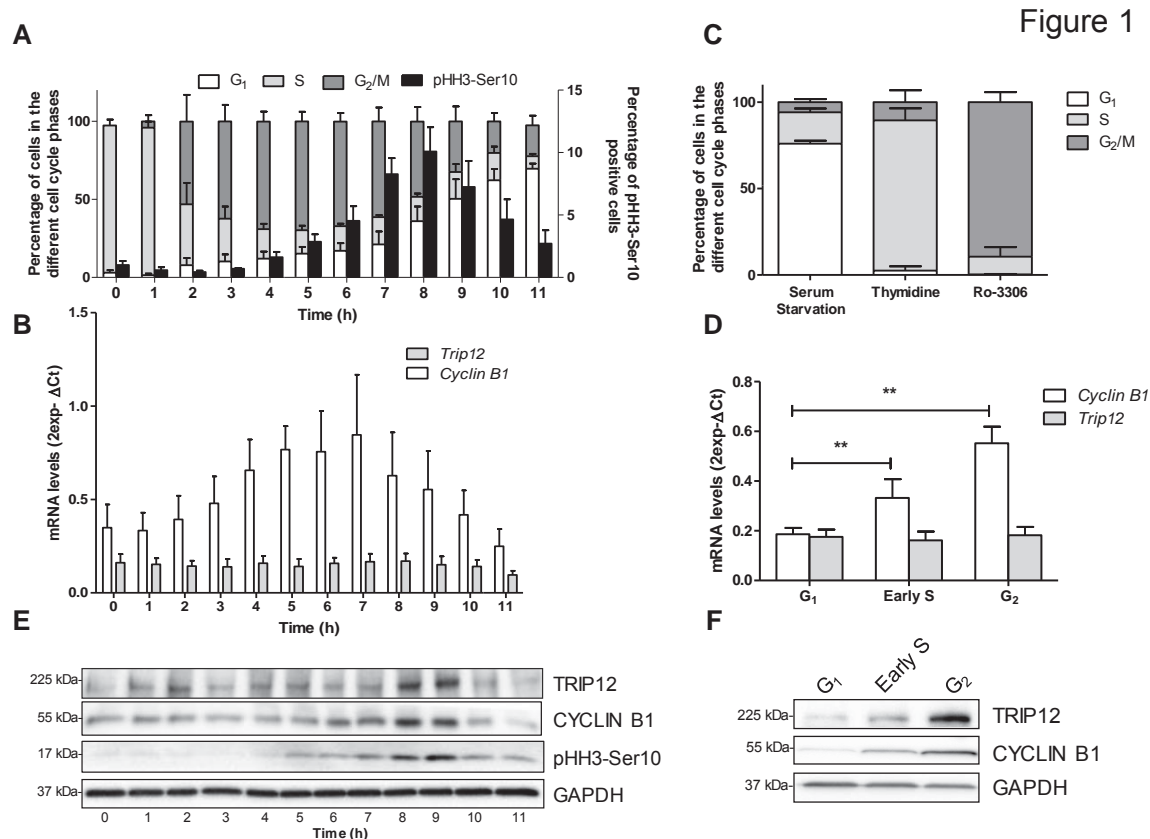


Figure 1: TRIP12 expression and nuclear localization are regulated during cell cycle. **A-** Distribution of cells in the different phases of the cell cycle and the percentage of pHH3-Ser10 positive cells (black bars) were assessed by flow cytometry in HeLaS3 cells arrested in early S phase using a double thymidine block and released in fresh medium for the indicated times. The bars represent the mean \pm SEM obtained from three different experiments. **B-** Expression level of *Trip12* and *Cyclin B1* mRNA was measured by RT-qPCR in HeLaS3 cells arrested in early S phase using a double thymidine block and released in fresh medium for the indicated times. The bars represent the mean \pm SEM of mRNA levels (expressed as $2^{\text{exp-}\Delta\text{Ct}}$) obtained from three different experiments. **C-** Distribution of HeLaS3 cells in the different phases of the cell cycle after serum starvation, double thymidine block and RO-3306 treatments was determined by flow cytometry. The bars represent the percentage expressed as a mean \pm SEM obtained from three different experiments. **D-** Expression level of *Trip12* and *Cyclin B1* mRNA was measured by RT-qPCR in HeLaS3 cells were arrested in G_1 , early S, and G_2 phase using serum starvation, double thymidine block and Ro-3306, respectively. The bars represent the mean \pm SEM of mRNA levels (expressed as $2^{\text{exp-}\Delta\text{Ct}}$) obtained from three different experiments. ** indicates a p value < 0.01. **E-** TRIP12, CYCLIN B1 and pHH3-Ser10 level was measured by Western blot analysis in HeLaS3 cells arrested in early S phase using a double thymidine block and released in fresh medium for the indicated times. GAPDH protein level was used as loading control. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. **F-** TRIP12 and CYCLIN B1 levels were measured by Western blot analysis in HeLaS3 cells arrested in G_1 , early S and G_2 phase using serum starvation, double thymidine block and Ro-3306 treatments, respectively. GAPDH protein level was used as loading control. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments.

Figure 1

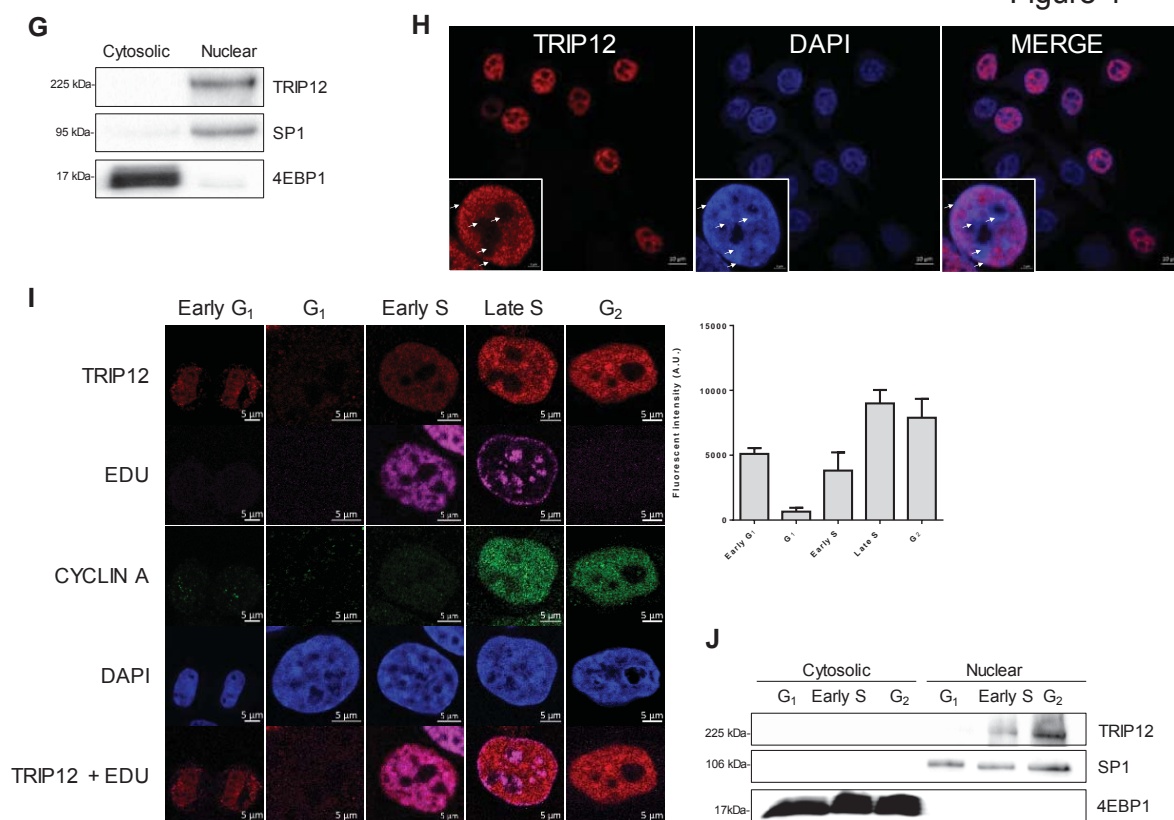


Figure 1: TRIP12 expression and nuclear localization are regulated during cell cycle **G-** TRIP12 protein level in cytosolic and nuclear fractions of HeLaS3 cells was measured by Western blot analysis. SP1 and 4EBP1 protein levels were used as purity controls of subcellular fractions. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. **H-** TRIP12 subcellular localization in HeLaS3 cells was determined by immunofluorescence using TRIP12 antibody (Sigma). The inset represents TRIP12 nuclear localization at a higher magnification. Nuclei were counterstained with DAPI. The white arrows indicate the peri-nucleolar and peri-nuclear heterochromatin regions. **I-** TRIP12 nuclear expression in HeLaS3 cells in the different phases of the cell cycle was determined by immunofluorescence using TRIP12 antibody (Sigma). Nuclei were counterstained with DAPI. Cells in G₁ phase and G₂ phase correspond to CYCLIN A/EDU nuclear negative cells and CYCLIN A nuclear positive/EDU negative cells, respectively. Cells in early S and late S phase correspond to EDU positive cells/CYCLIN A negative and positive nuclear cells, respectively. The graph represents the mean TRIP12 expression (integrated density-background) \pm SEM determined at least 200 cells using FIJI software. **J-** Level of TRIP12 in cytosolic and nuclear protein fraction of G₁-, early S- and G₂-phase enriched HeLaS3 cell populations was measured by Western blot analysis. SP1 and 4EBP1 protein levels were used as purity control of subcellular fractions. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments.

2- TRIP12 tightly associated with chromatin through an N-terminal intrinsically disordered region.

Exclusively localized in the nucleus, and more specifically on euchromatin regions (**Fig. 1H**), we showed that TRIP12 can be physically associated with chromatin (**Fig. 2A**). We confirmed this association by showing TRIP12 localization during the different steps of mitosis when chromatin is subject to condensation and decondensation (**Fig. 2B**). The interaction with chromatin during metaphase was also observed using a HA-tagged TRIP12 construct (**Fig. S2A**). Chromosome spreading experiments revealed that TRIP12 is strongly associated with chromatin on full-length chromosomes (**Fig. 2C and Fig. S2B**).

We identified several IDRs in TRIP12 sequence that could be potential chromatin interacting-domains, notably one in the N-terminus located between aa 1 and 440 aa (**Fig. 2D**). The subcellular localization of full-length TRIP12-GFP and four TRIP12-GFP deletion constructs led us to conclude that, like the endogenous TRIP12, TRIP12(1-1992)-GFP localizes exclusively in the nuclear compartment. More importantly, the TRIP12(1-445)-GFP localizes in the nucleus demonstrating that the N-terminal IDR is sufficient for the nuclear localization of TRIP12 (**Fig. S3A**). A similar analysis in metaphasic cells showed that TRIP12 interaction with chromatin is mediated by its N-terminal IDR. Whereas the deletion of the C-terminal HECT domain (TRIP12(1-1552)-GFP) does not affect the capacity of the fusion protein to colocalize with chromatin, the deletion of the IDR (TRIP12(446-1992)-GFP) abolishes it (**Fig. 2E**). Moreover, IDR alone can ensure a physical direct interaction with naked DNA (**Fig. 2F**) and the localization of GFP on full-length metaphasic chromosomes (**Fig. S3B and S3C**). The colocalization of TRIP12 and its IDR with chromatin was confirmed in living cells (**Fig. S3D**). A more precise analysis of the IDR reveals that the region between amino acids 107 and 325 ensures the tight interaction of TRIP12 with chromatin (**Fig. S3E and S3F**). Interestingly, cells that express high level of the IDR construct display characteristic features of cells in prophase with condensed chromosomes covering the inner face of the nuclear membrane (**Fig. S3G, white arrow**) even if they are not pHH3-Ser10 positive (**Fig. S3H, bottom panel**) as they should be a normal cell (**Top panel**). This suggests that TRIP12 *via* its IDR could participate in chromatin condensation.

Altogether, our experiments identify a new functional domain of TRIP12 that permits the tight association of the protein to the chromatin.

Figure 2

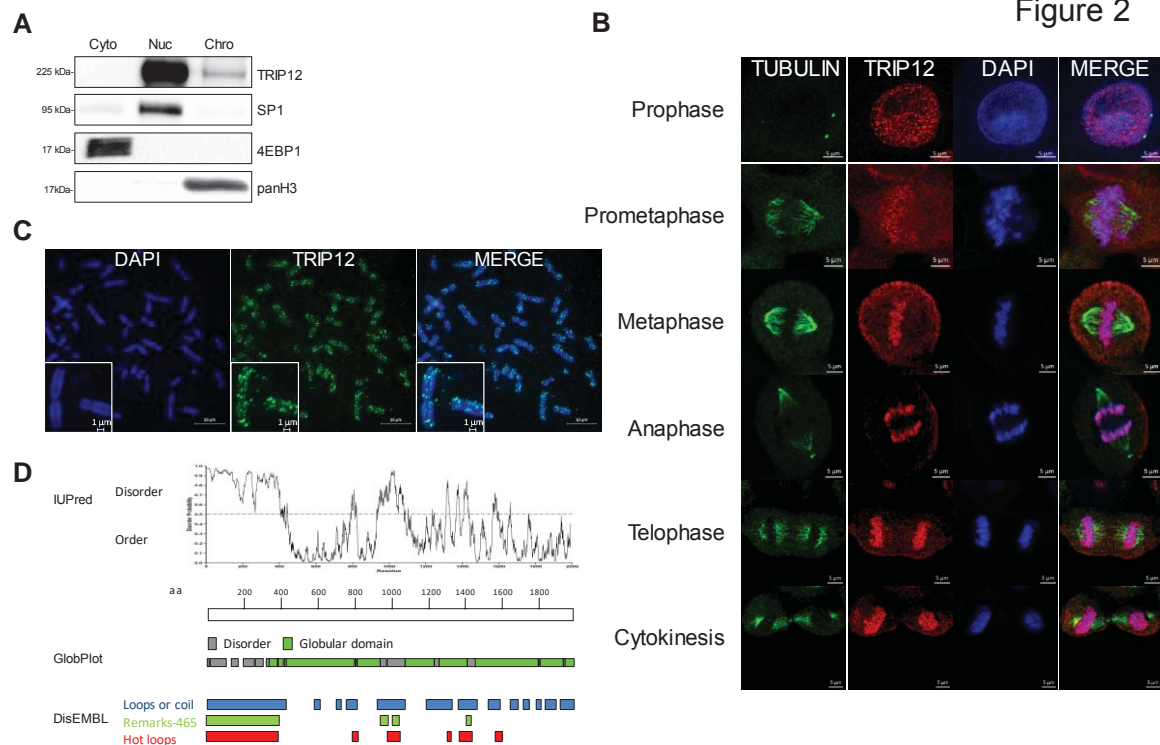
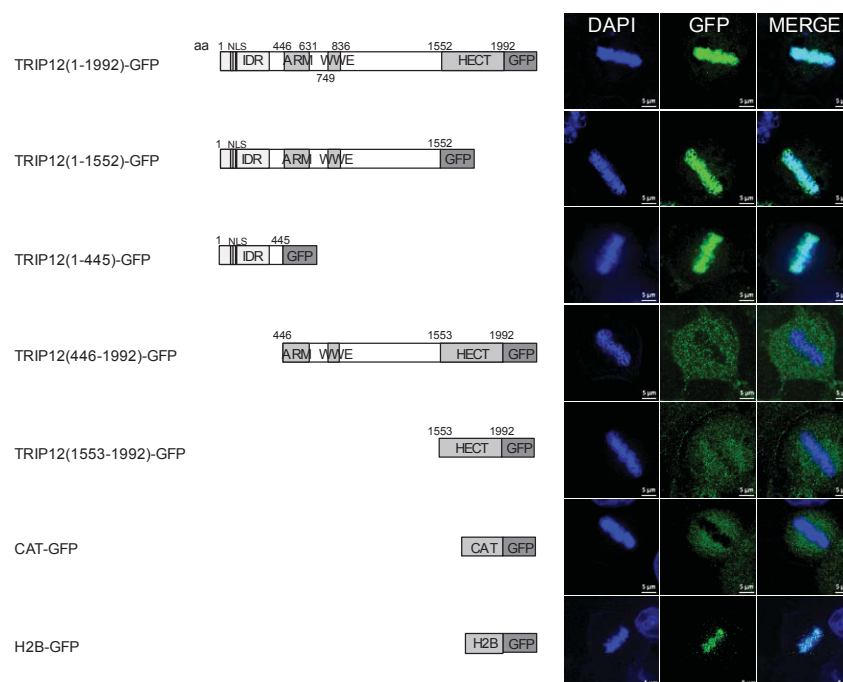


Figure 2: TRIP12 tightly associated with chromatin through an N-terminal intrinsically disordered region. **A-** TRIP12 expression in cytosolic (Cyto), nuclear (Nuc) and chromatin-bound (Chro) subcellular fractions was measured by Western blot analysis. SP1, 4EBP1 and panH3 protein levels were used as purity control of the different fractions. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. **B-** TRIP12 and γ -TUBULIN localization in HeLaS3 cells in prophase, prometaphase, metaphase, anaphase, telophase and cytokinesis were visualized by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI. **C-** TRIP12 localization on metaphasic chromosomes was visualized by immunofluorescence using anti-TRIP12 antibody (Sigma) after chromosome spreading of HeLaS3 cells treated with Ro-3306 and released in the cell cycle for 45 min. DNA was counterstained with DAPI. The inset represents a magnification of TRIP12 localization on two individual chromosomes. **D-** Prediction of intrinsically disordered and ordered regions in TRIP12 protein sequence (Protein accession number NP_004229.1) was determined using IUPred, GlobPlot and DisEMBL software. aa stands for amino acids.

Figure 2

E



F

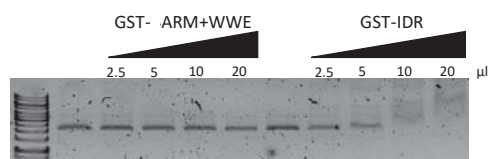


Figure 2: TRIP12 tightly associated with chromatin through an N-terminal intrinsically disordered region. E- GFP-fusion protein localization in metaphasic HeLaS3 cells transfected with TRIP12 (1-1992), (1-1552), (1-445), (446-1992) and (1553-1992)-GFP constructs was visualized by immunofluorescence using an anti-GFP antibody. H2B-GFP and CAT-GFP constructs were used as controls. Nuclei were counterstained with DAPI. IDR stands for Intrinsically Disordered Region, NLS for Nuclear Localization Signal, ARM for β -Armadillo domain, WWE for tryptophan and glutamate enriched domain and HECT for Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus. Numbers indicate amino acids (aa) position. F- Interaction of increasing amounts of GST-TRIP12-ARM-WWE(446-1000) and GST-IDR(1-325) with naked plasmid DNA visualized after migration on agarose gel.

3- Deregulated expression of TRIP12 affects cell division and mitotic entry.

Given TRIP12 cell cycle dependent-expression and chromatin association, we tested the consequences of a TRIP12 ectopic over-expression on cell fate during 48h. We found that only 26.7% (8 out of 30) of TRIP12(1-1992)-GFP cells undergo two cell divisions or more (**Fig. 3A and 3B**) with a duration in interphase of 19.2h (**Fig. 3C**). The remaining 73.7% (22 out of 30) fail to achieve a single division and die (**Fig. 3A and Fig. S4A**). Remarkably, this death occurs at a time (20.1h) that mitosis should occur (**Fig. 3C**) suggesting that TRIP12 overexpression is deleterious for the mitotic division. This inhibitory effect on cell division was also observed after expression of an inactive mutant as well as several TRIP12 protein domains (**Fig. 3A and Fig. S4B-S4D**) with the exception of the IDR of TRIP12 (**Fig. 3A and 3C**) suggesting that the mitotic inhibitory effect of TRIP12 does not require its binding to the chromosomes or its catalytic activity. We further demonstrated that TRIP12 over-expression diminishes the percentage of cells that enter in mitosis (**Fig. 3D**). When we focused on TRIP12(1-1992)-

GFP expressing cells that undergo cell divisions (**Fig. 3A**), we noticed that TRIP12 over-expression significantly delays entry into prophase 30 min after Ro-3306 release (**Fig. 3E, Graph**).

The inhibitory effect of TRIP12 over-expression on mitotic entry led us to investigate the consequences of a TRIP12 depletion on mitotic entry. Toward this end, TRIP12-depleted (ShTRIP12) and control (ShScr) cells were created using shRNAs (**Fig. 4A and 4B**). After Ro-3306 release (30 min), we microscopically observed an accelerated mitotic entry in TRIP12-depleted cells (**Fig. 4C**) that was associated to a higher percentage of cells in late prometaphase and metaphase (**Fig. 4D**). The accelerated mitotic entry was confirmed by flow cytometry-measurements of pHH3-Ser10 positive cells (**Fig. 4E**). A normal mitotic entry of TRIP12 depleted cells was restored by a transient expression of TRIP12 or the catalytic mutant but not by an expression of the IDR (**Fig. S5A**).

Altogether, these experiments reveal the important contribution of TRIP12 in mitotic entry as a deregulated expression of TRIP12 significantly impedes the proper setting of mitotic entry-regulatory mechanisms.

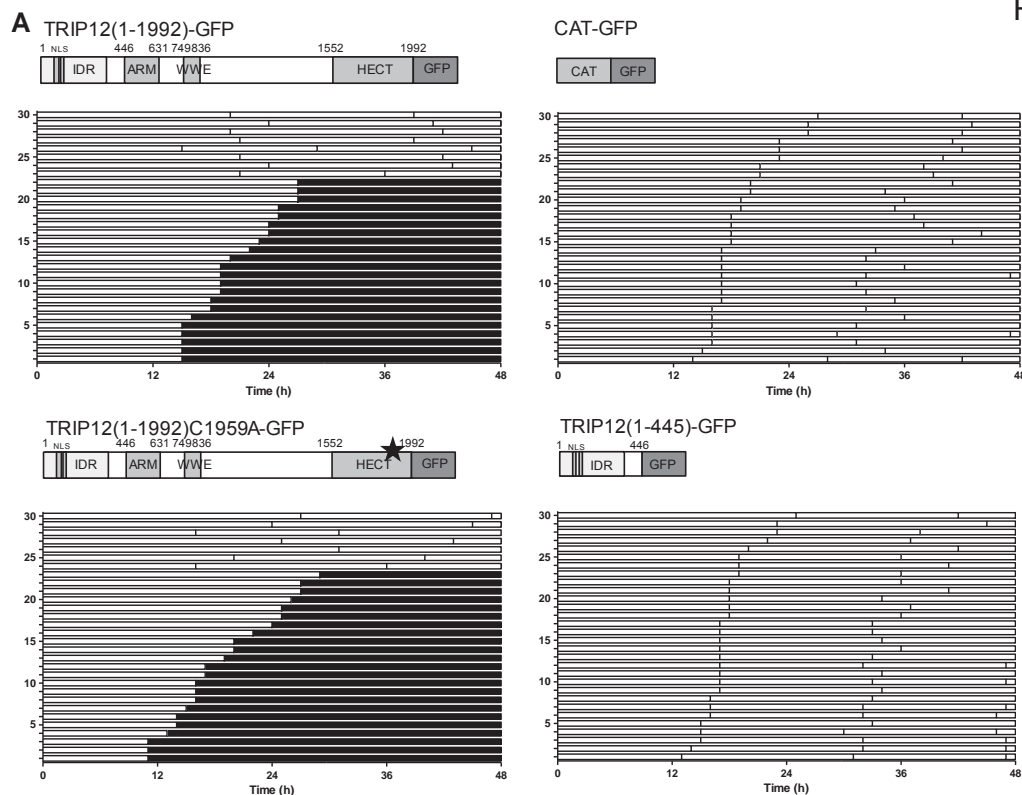


Figure 3: Over-expression of TRIP12 affects cell division by delaying mitotic entry. A- GFP-positive HeLaS3 cells were imaged every hour for 48h after transient transfection with TRIP12(1-1992)-GFP, TRIP12(1-1992-C1959A)-GFP, TRIP12(1-445)-GFP and CAT-GFP constructs. Thirty GFP-positive cells obtained from three different experiments were analyzed. Each white horizontal bar represents time spent in interphase of one cell. Each vertical bar between white bars indicates cell division. Bars in black correspond to time spent after cell death.

Figure 3

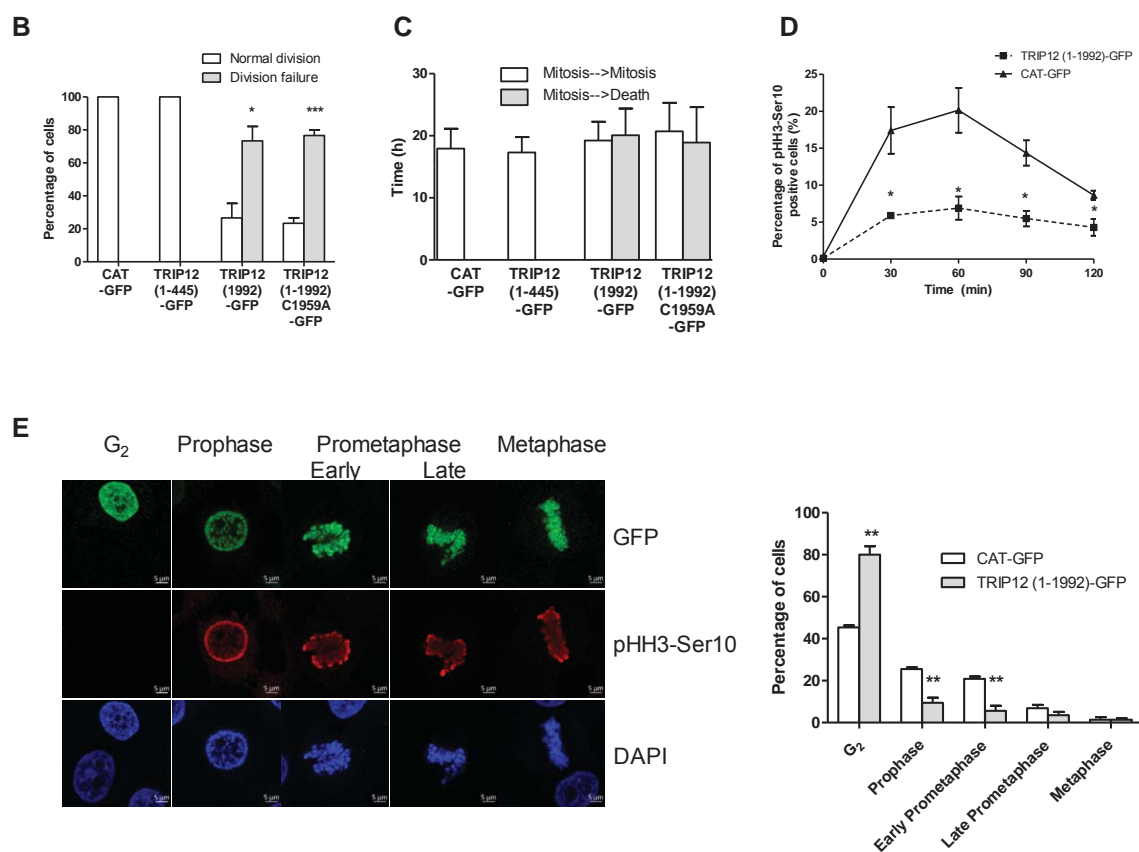


Figure 3: Over-expression of TRIP12 affects cell division by delaying mitotic entry. **B-** The graph represents the percentage \pm SEM of GFP-cells that overcome at least two cell divisions or die over a 48h-period. * and *** indicate a p value < 0.05 and < 0.001 , respectively. **C-** The graph represents the average duration \pm SEM in interphase between two mitoses (white bars) and between mitosis and cell death (grey bars) in the different GFP positive cells. **D-** Percentage of pHH3-Ser10 positive in HeLaS3 cells transfected with TRIP12(1-1992)-GFP or control CAT-GFP constructs and arrested by Ro-3306 treatment was assessed by flow cytometry after release in inhibitor free medium every 30 min for 2h. The graph represents the mean \pm SEM of three different experiments. * indicates a p value < 0.05 . **E-** Proportion of cells in G₂, prophase, early prometaphase, late prometaphase and metaphase in HeLaS3 cells previously transfected with TRIP12(1-1992)-GFP or control CAT-GFP constructs was determined by immunofluorescence using anti-GFP (top panel) and anti-pHH3-Ser10 (middle panel) antibodies. Forty-eight hours after transfection, cells were arrested in G₂ phase by a Ro-3306 treatment and released in inhibitor free medium for 30 min. GFP-positive cells that were negative for pHH3-Ser10 staining were considered in G₂ phase. DNA was counterstained with DAPI. The graph represents the percentage of cells in the different phases expressed as mean \pm SEM obtained from a minimum of 300 cells of three different experiments. ** indicates a p value < 0.01 .

Figure 4

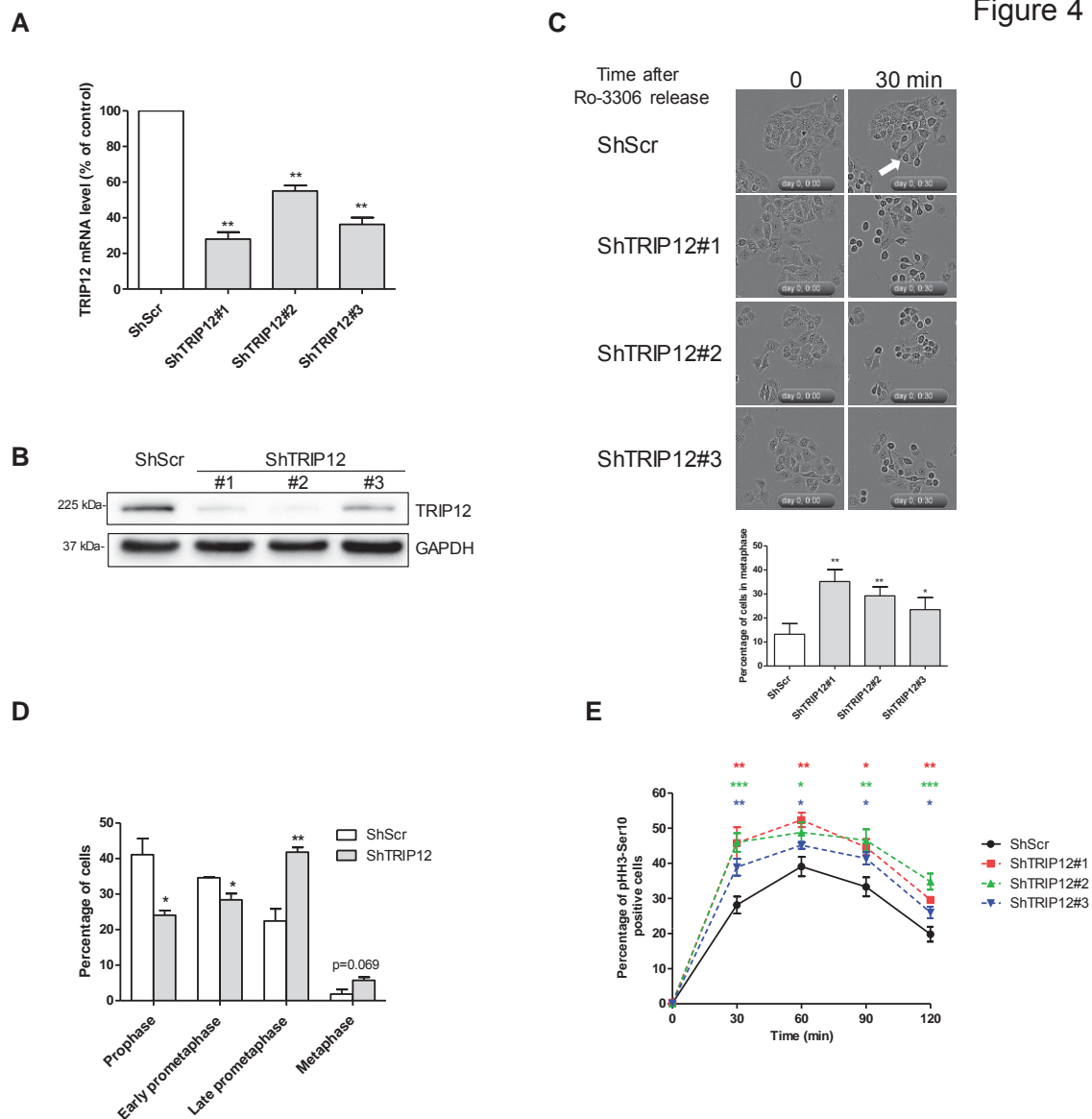


Figure 4: TRIP12 depletion accelerates mitotic entry. **A-** Expression of *Trip12* mRNA was determined by RT-qPCR in HeLaS3 cells transduced with 3 shRNAs directed against *Trip12* mRNA (ShTRIP12) or scramble control shRNA (ShScr). β -Actin, *Gapdh* and *Cyclophilin A* mRNA level was used for normalization. Results are the mean \pm SEM obtained from three different experiments and expressed as percentage of expression compared to ShScr control cells. ** indicates a p value < 0.01. **B-** Expression of TRIP12 protein in HeLaS3 ShTRIP12 and ShScr cells was determined by Western blot analysis. GAPDH protein level was used as loading control. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. **C-** Percentage of cells in metaphase in TRIP12-depleted (ShTRIP12#1, #2 and #3) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested by a Ro-3306 treatment and released in the cell cycle by medium replacement (t=0) was determined by cell live microscopy. The graph represents the percentage of cells in metaphase phenotype expressed as mean \pm SEM relatively to total number of cells. A cell was considered in metaphase phenotype when the equatorial plate was microscopically visualized. A representative cell in metaphase phenotype is indicated by the white arrow. The quantification was performed from 9 different fields from three different experiments representing an average of 650 analyzed cells. * and ** indicates a p value < 0.05 and 0.01, respectively. **D-** Proportion of cells in prophase, early prometaphase, late prometaphase and metaphase in TRIP12-depleted (ShTRIP12#1) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested by a Ro-3306 treatment and released in the cell cycle by medium replacement was determined by immunofluorescence using anti-pHH3-Ser10 antibody after 30 min. DNA was counterstained with DAPI. The graph represents the percentage of cells in the different steps of early mitosis expressed as mean \pm SEM obtained from a minimum of 300 cells of three different experiments. * and ** indicate a p value < 0.05 and 0.01, respectively. **E-** Percentage of pHH3-Ser10 positive cells in TRIP12-depleted (ShTRIP12) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested in G₂ phase by a Ro-3306 treatment and released in the cell cycle by medium replacement was determined by flow cytometry at the indicated time. Three different ShTRIP12 (#1, #2 and #3) were used for these experiments. The results represent the mean \pm SEM obtained from four different experiments. *, ** and *** indicate a p value < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

4- Shortened duration of DNA replication explains the accelerated mitotic entry of TRIP12-depleted cells.

We decided to determine the causes of the accelerated mitotic entry of TRIP12-depleted cells. Mitotic entry is governed by a succession of events that leads to the condensation and the segregation of chromosomes into daughter cells. Among them, the Tyr15-dephosphorylation of CDK1 and the kinase WEE1-cytosolic translocation are essential (Enders, 2010; Lindqvist et al., 2007). In Ro-3306 cells, we simultaneously found a decreased level of phosphorylation on CDK1-Tyr15 in the nuclear fraction of TRIP12-depleted cells and a WEE1 translocation from the nuclear to the cytosolic fraction (**Fig. 5A and Fig. S5B**) which provokes the accelerated entry in prophase when Ro-3306 is removed (**Fig. S5C**). It is reported that the cytosolic translocation of WEE1 is mediated by CYCLIN A nuclear import which begins early during S phase to allow DNA replication *via* the activation of the kinase CDK2 (Coverley et al., 2002; Li et al., 2010). We measured an increase in CYCLIN A expression in the nuclear fraction that is associated to a decreased expression in cytosolic fraction of these cells (**Fig. 5B and Fig. S5D**). This corroborates with a significant increased proportion of cells with CYCLIN A nuclear staining in TRIP12-depleted cells (**Fig. 5C**). The important role of CYCLIN A in DNA replication led us to investigate the status of DNA replication in CYCLIN A nuclear-positive cells. Our analyses revealed a higher percentage of TRIP12-depleted cells with achieved DNA replication (G₂ cells) in (**Fig. 5C**). These G₂ cells correspond to the cells that enter into mitosis immediately after Ro-3306 release (**Fig. 4C or 4E**). More importantly, these results strongly suggest that a TRIP12 depletion accelerates DNA replication. We verified this hypothesis by measuring that the duration of S phase is significantly shorter in TRIP12 depleted-cells as compared to controls (**Fig. 5D**). Euchromatin regions are replicated early during S phase when heterochromatin regions are replicated in late S phase. Interestingly, we measured in EDU-positive asynchronous cells a higher proportion of cells in late S in TRIP12-depleted cells demonstrating that the depletion of TRIP12 specifically accelerates the DNA replication of euchromatin regions. This result is in accordance with the fact that TRIP12 preferentially colocalizes with euchromatin regions (**Fig. 1H**).

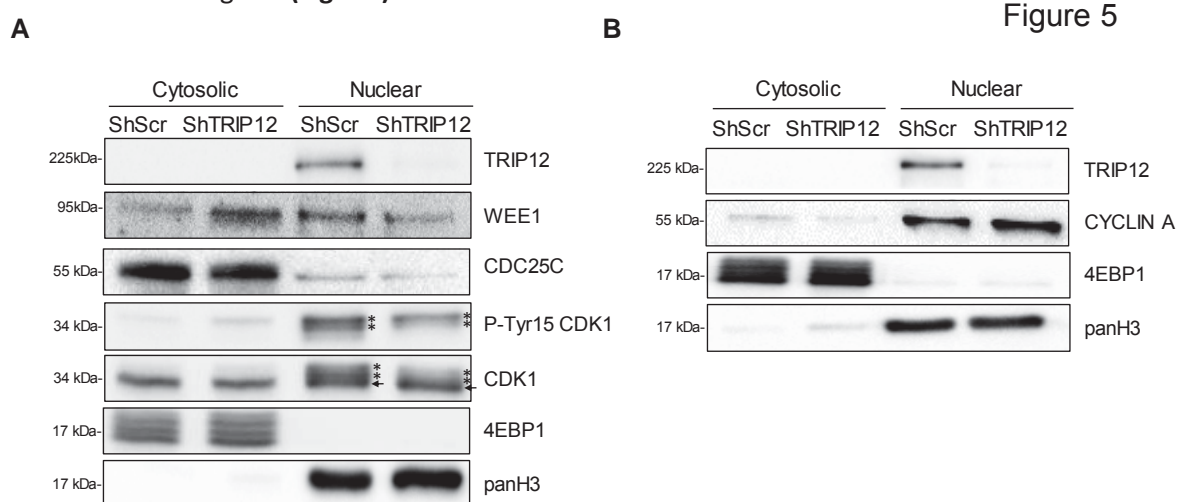


Figure 5: Shortened duration of DNA replication explains the accelerated mitotic entry of TRIP12-depleted cells. **A-** TRIP12, WEE1, CDC25C and CDK1 protein and P-Tyr15-CDK1 phosphorylation levels in nuclear and cytosolic fractions of TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells after a Ro-3306 treatment were determined by Western blot analysis. 4EBP1 and panH3 protein levels were used as loading and purity controls. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. The asterisk and the arrow indicate the position of phosphorylated and non-phosphorylated forms of CDK1, respectively. **B-** CYCLIN A level in nuclear and cytosolic fractions of TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells after Ro-3306 treatment was determined by Western blot analysis. 4EBP1 and panH3 protein levels were used as loading and purity controls. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments.

Figure 5

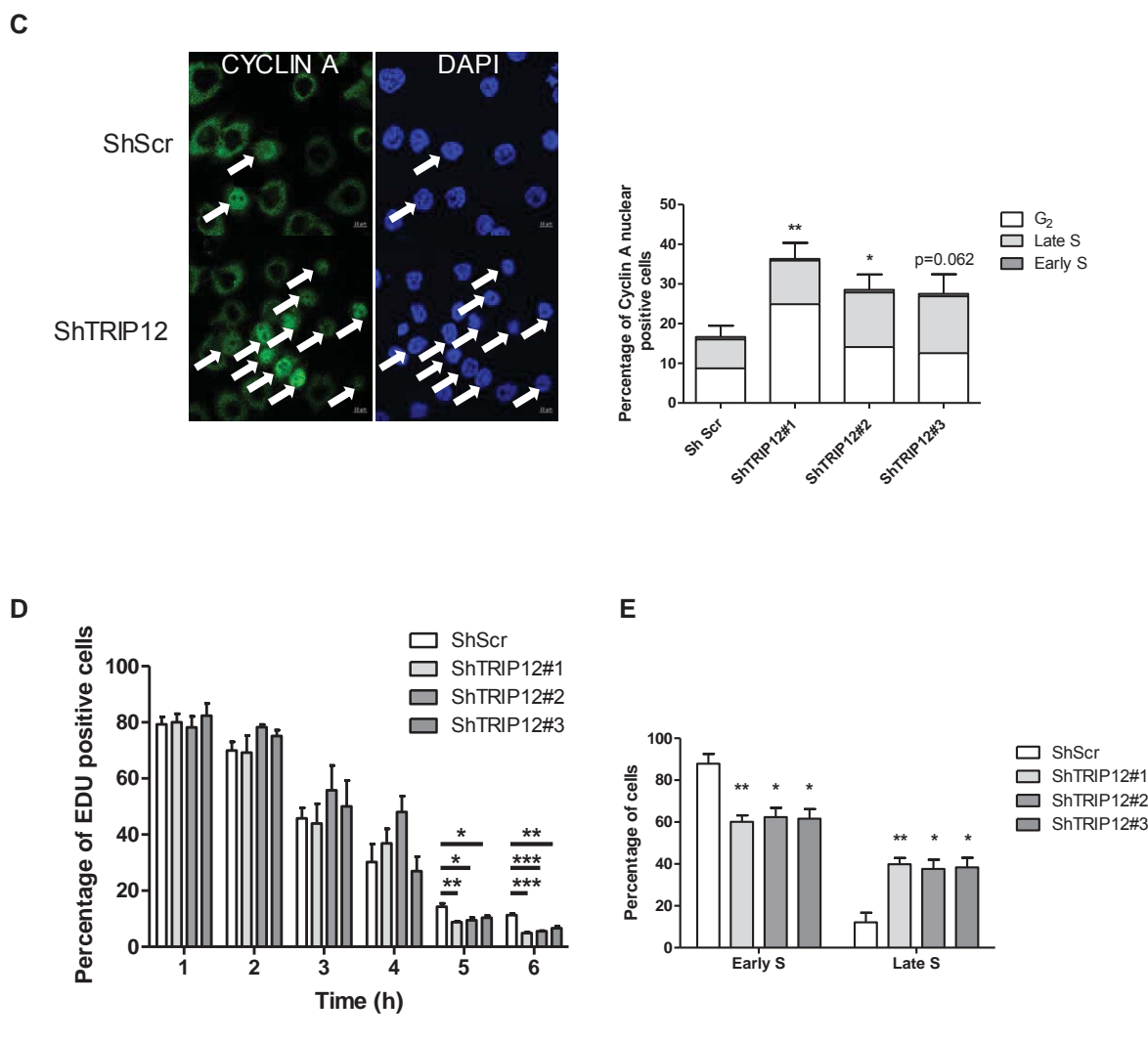


Figure 5: Shortened duration of DNA replication explains the accelerated mitotic entry of TRIP12-depleted cells. **C-** CYCLIN A nuclear presence in TRIP12-depleted and control cells after RO-3306 treatment was determined by immunofluorescence. The image illustrates representative cells with nuclear CYCLIN A (white arrows) or not. The graph represents the percentage of cells expressed as mean \pm SEM obtained from three different experiments. * and ** indicate a p value < 0.05 and 0.01 , respectively. Percentage of cells in G₂ phase (white bars), late S (light grey bars) and early S (dark grey bars) was determined by immunofluorescence using criteria defined in Fig 1I. The bars represent the mean obtained from three different experiments. **D-** Percentage of EDU positive cells in TRIP12-depleted (ShTRIP12) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested in early S phase by a double thymidine block treatment and released in the cell cycle was determined by EDU incorporation at the indicated time. The graph represents the mean \pm SEM obtained from a minimum of 2500 cells for each indicated time of three different experiments. *, ** and *** indicate a p value < 0.05 , 0.01 and 0.001 , respectively. **E-** Percentage of early S and late S cells in EDU-positive TRIP12-depleted (ShTRIP12) and control (ShScr) HeLaS3 cells was determined by immunofluorescence using criteria defined in Fig 1I. The graph represents the mean \pm SEM obtained from a minimum of 500 EDU-positive cells of three different experiments. * and ** indicate a p value < 0.05 and 0.01 , respectively.

5- TRIP12 depletion prolongs the SAC activation, leads to chromosome segregation defects and cell growth inhibition.

In addition to accelerate DNA replication, we observed that a TRIP12 depletion can lead to other cellular alterations such as a prolonged activation of the SAC. We observed that in control cells, the percentage of pHH3-Ser10 positive cells reaches a maximum at $t=60$ min before the physiological loss of pHH3-Ser10 at the metaphase-to-anaphase transition (**Fig. 4E**). In contrast, this percentage persists at a maximal level for 60 min ($t=30$ min to $t=90$ min) in TRIP12-depleted cells suggesting an inhibition of the metaphase/anaphase transition. This inhibition could be due to a prolonged activation of the SAC or a default of the APC/C complex. The use of reversine, a SAC inhibitor, proved a prolonged activation of the SAC in absence of TRIP12 (**Fig. S5E**). We confirmed the extended duration of prometaphase-metaphase by measuring a significantly increased duration of prometaphase (from invagination of the nuclear membrane) to metaphase in TRIP12-depleted cells (90.1 min) compared to control cells (53.5 min) (**Fig. 6A and 6B**). Additionally, we observed that TRIP12-depleted cells largely fail to transit from metaphase to anaphase (32.3% vs 3.7%). Among them, 36 % exit mitosis by mitotic slippage and 64% die (**Fig. 6C**). Cell death and mitotic slippage are two processes by which cells overcome an extended arrest in prometaphase. A long term arrest in prometaphase and cohesion fatigue can lead to different chromosome segregation abnormalities such as the formation of chromosome laggings, anaphase bridges and alterations that are visible in interphasic cells such as micronuclei or giant nuclei (consequence of mitotic slippage). Among cells that achieve the metaphase-to-anaphase transition, our analysis revealed a higher percentage of chromosome lagging, anaphase bridges, micronuclei and giant nuclei in ShTRIP12 cells (**Fig. 6D-E and Fig. S5F**). These results indicate that TRIP12 also ensures the maintenance of chromosome integrity and therefore the stability of the genome.

The consequences of TRIP12 depletion on S phase duration, mitotic entry and progression led us to investigate the effects on cellular growth. Interestingly, depletion of TRIP12 provokes a significant diminution of cell growth (30.3% after 72h) *in vitro* (**Fig. 6F**) also visible by colony formation assay (**Fig. 6G**) and *in vivo* in SCID mouse model after sub-cutaneous injections (**Fig. 6H**). This reduced cell growth was associated to an accumulation of cells in G₂/M phase (**Fig. 6I**) that could be explained by the combination of the increased duration of prometaphase-metaphase (**Fig. 6B**) and the higher percentage of cells that exit mitosis by mitotic slippage with 4n DNA content (**Fig. 6C**). Moreover, this reduced growth is accompanied by an increased proportion of sub-G₁ cells (**Fig. 6I**) which could correspond to the TRIP12-depleted cells that die at the metaphase-to-anaphase transition (**Fig. 6C**).

Figure 6

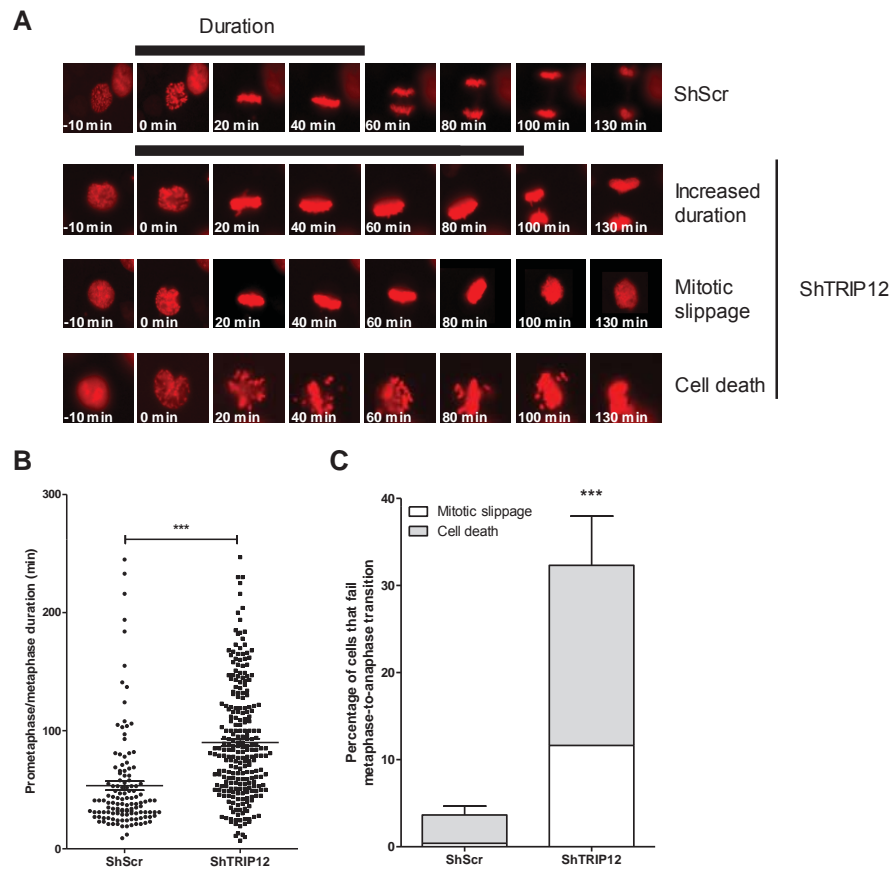


Figure 6: TRIP12 depletion prolongs the SAC activation, leads to chromosome segregation defects and cell growth inhibition. **A-** Representative images of the different fate of TRIP12-depleted cells during 140 min. TRIP12-depleted (ShTRIP12#1) and control (ShScr) H2B-dsRed HeLaS3 were arrested by a Ro-3306 treatment. Cells were released in the cell cycle and followed by live microscopy for 6h. The black bar represents the duration of prometaphase-metaphase. **B-** Duration of prometaphase-metaphase was measured from the invagination of the nuclear membrane to the separation of sister chromatids in 125 control cells and 244 TRIP12#1-depleted cells. The horizontal bar represents the mean \pm SEM from three different experiments. *** represents a p value < 0.001.

Figure 6

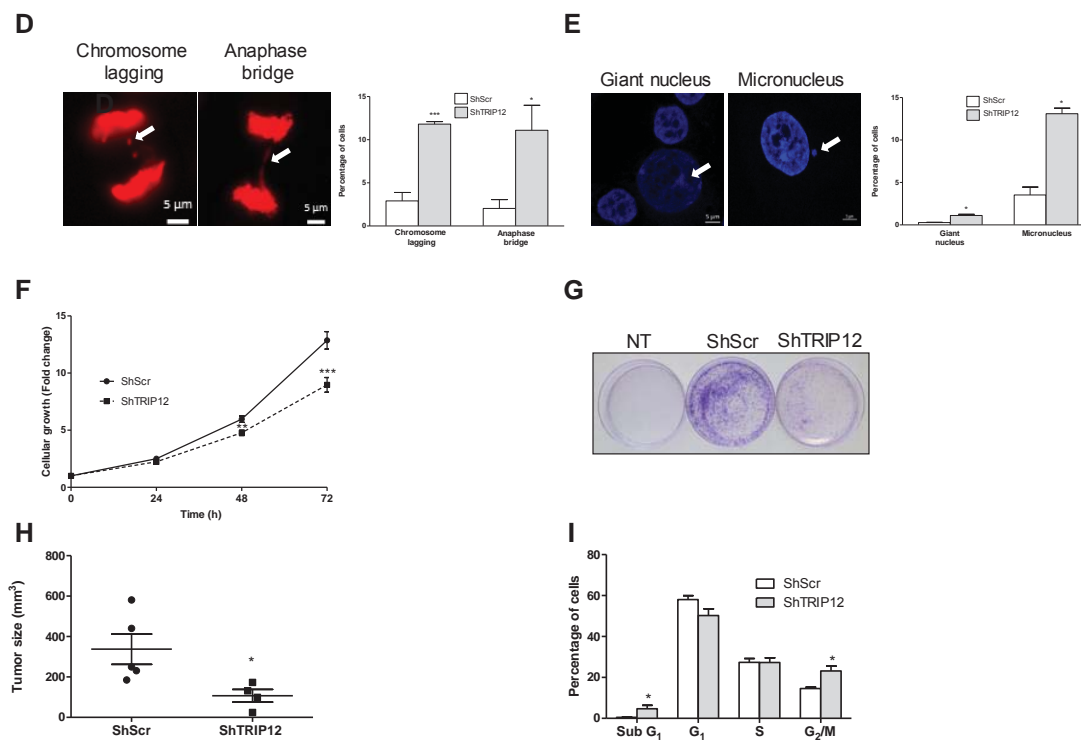


Figure 6: TRIP12 depletion prolongs the SAC activation, leads to chromosome segregation defects and cell growth inhibition. **C-** Percentage of cells that fail the transition metaphase-to-anaphase in TRIP12#1-depleted and control H2B-dsRed HeLaS3 cells. The bars represent the mean \pm SEM obtained from three different experiments. *** represents a p value < 0.001. Percentage of cells that exit mitosis via mitotic slippage (white bars) and cell death (grey bars). The bars represent the mean obtained from three different experiments. **D-** Chromosome laggings and anaphase bridges in TRIP12-depleted and control H2B-dsRed HeLaS3 cells arrested by Ro-3306 treatment and released in the cell cycle were quantified by live cell microscopy. The images are representative of a chromosome lagging and an anaphase bridge observed in TRIP12-depleted H2B-dsRed HeLaS3 cells. The graph represents the percentage of cells with chromosome segregation defects expressed as a mean \pm SEM and obtained from 344 TRIP12-depleted and 251 control cells of three different experiments. * and *** indicate a p value < 0.05 and 0.001, respectively. **E-** Micronucleus and giant nuclei in asynchronous TRIP12-depleted or control HeLaS3 cells were quantified by immunofluorescence after DAPI staining. The graph represents the percentage of cells expressed as a mean \pm SEM and obtained from a minimum of 10^3 cells of three different experiments. * indicates a p value < 0.05. **F-** Cell growth of TRIP12-depleted and control cells was measured by cell counting. Cells were seeded at $5 \cdot 10^4$ cells/well of 6-wells plate and counted the day after (t=0) and every 24h the three following days. Results are expressed as fold change \pm SEM relatively to t=0. Results were obtained from 7 different experiments. ** and *** indicate a p value < 0.01 and 0.001, respectively. **G-** Colony formation assay of HeLaS3 cells transduced or not (NT) with ShScr and ShTRIP12 expressing lentiviral particles. Forty-eight hours after transduction, cells were seeded in a 10 cm-plate and selected with puromycin for 11 days. Colonies were fixed and counterstained with crystal violet. The images are representative of at least three different experiments. **H-** In vivo tumor progression of TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells. Cells (10^6 cells) were sub-cutaneously injected into Scid mice (n=5). After 5 weeks, mice were sacrificed and tumor volume was determined. Results are expressed in mm³ \pm SEM. * indicates a p value < 0.05. **I-** Distribution of TRIP12-depleted and control cells in the cell cycle was determined by flow cytometry after propidium iodide incorporation. The percentage of cells in the different phases of the cell cycle is expressed as a mean \pm SEM and was obtained from at least 7 different experiments. * indicates a p value < 0.05.

DISCUSSION.

The E3 ubiquitin ligase TRIP12 was linked to the control of cell cycle regulators (*i.e.*: p14/ARF, p16/CDKN2A) (Kajiro et al., 2011). In this study, we provide evidence that TRIP12 expression varies during the cell cycle and correlates with its nuclear localization. More importantly, we identify a functional N-terminal domain that confers to TRIP12 the capacity to strongly associate with euchromatin. We demonstrate the role of TRIP12 in mitotic entry by affecting the duration of S phase. Moreover, we reveal the implication of TRIP12 in the control of SAC activation, proper chromosome segregation and in cell proliferation.

In line with the function in mitotic entry, TRIP12 over-expression and depletion alter initiation of mitosis. Therefore, fine tuning of TRIP12 expression and/or activity is essential for the control of this phase. Similar observations are reported for other important mitotic proteins such as CYCLIN A. Indeed, CYCLIN A over-expression delays chromosome alignment and sister chromatid segregation (den Elzen and Pines, 2001). The knock down of CYCLIN A by siRNA strategy delays the entry into mitosis by postponing cells in G₂ phase (De Boer et al., 2008). Although the mechanisms that govern its expression during the cell cycle need to be further studied, our findings indicate that *de novo Trip12* mRNA expression is not involved. These observations corroborate the *Whitfield et al.* study, which provides an exhausting list of HeLaS3 mRNAs that fluctuate during cell cycle (Whitfield et al., 2002). *Trip12* mRNA is not present in this list. It is plausible that induction of TRIP12 protein expression in S phase could be mediated by an IRES (Internal Ribosome Entry site) dependent-translational regulation as demonstrated for *Aurora A kinase* mRNA (Dobson et al., 2013). Comparative proteomics approaches during cell cycle identified TRIP12 as a newly synthesized protein in S phase which is in favor of a translational regulation of *TRIP12* mRNA during cell cycle (Chen et al., 2016). Moreover, the disappearance of TRIP12 from the nucleus in G₁ phase-cells could imply its degradation by the proteasome mediated by APC/C-dependent ubiquitination as TRIP12 possesses putative KEN box (aa 1496-1570/UniProt source) and Destruction boxes (aa 859-867 and aa 1546-1554/ELM resource). This degradation mechanism may explain the decrease of TRIP12 expression. However, other actors that ensure TRIP12 stability remain to be identified. Similar to UHRF1, TRIP12 is stabilized by USP7 (Cai et al., 2015). During mitosis, CDK1 initiates UHRF1 degradation by phosphorylating the USP7-interacting domain (Ma et al., 2012). The same mechanism could exist for TRIP12 degradation since a recent quantitative phospho-proteome approach identified serine 424 residue of TRIP12 as a CDK1 phosphorylation target (Petrone et al., 2016). Moreover, our preliminary results are in favor of a role of USP7 in the cell cycle regulation of TRIP12. Therefore, the variation of TRIP12 expression during cell cycle likely involves different layers of regulation including translation efficiency and protein stabilization.

Another question that will need to be addressed is whether TRIP12 exerts its function in mitotic entry through its catalytic activity or by protein-protein interaction. Our observations favor a catalytically-independent function (**Fig 3A-C and Fig. S4**). However, these experiments were performed in an over-expression context of catalytic mutant. In this context, we show that an over-expression of several different TRIP12 domains (except the N-terminal domain) leads to an inhibition of cell division (**Fig. S4**). In these conditions, we cannot completely be certain that TRIP12 function in mitotic entry is independent of its catalytic activity. Moreover, TRIP12-GFP transfection leads to uncontrolled TRIP12 expression throughout all cell cycle phases whereas endogenous TRIP12 is tightly regulated during cell

cycle. Formulation of a specific inhibitor of TRIP12 enzymatic activity would be required to definitely address this question.

We further demonstrate that TRIP12 interacts with chromatin *via* an IDR. IDRs are found in a multitude of proteins and participate in protein-, DNA-, or RNA-protein interactions (Dyson and Wright, 2005; Peng and Kurgan, 2015). DNA binding proteins are significantly enriched in disordered domains in Eukaryotes (Wang et al., 2016). Many IDRs are functional, adopting a well-defined conformation upon interaction with target molecules. IDRs constitute important regulatory regions such as the N-terminus of histones as they are subject to numerous post-translational modifications (Hansen et al., 2006) and TP53 protein (Krois et al., 2016). To our knowledge, TRIP12 is the first demonstrated E3 ubiquitin ligase interacting with chromatin through an IDR domain. The staining on full-length chromosomes demonstrates that TRIP12 interacts through its IDR with the entire genome suggesting a widespread role of TRIP12 on genome organization and potentially on global gene expression.

We showed that TRIP12 depletion accelerates mitotic entry by shortening the DNA replication phase. DNA replication is a highly ordered process that ensures cells replicate their genome. It requires the sequential assembly of protein complexes such as the pre-replication complex, the pre-initiation complex and the replisome. TRIP12 could participate in the regulation of DNA replication by interacting or controlling the expression of replication complex components. Interestingly, TRIP12 was found in the RPA interactome (Maréchal et al., 2014). Our personal comparative proteomic analysis (SWATH-MS) identified an increased expression of the cyclin dependent kinase CDK6 in TRIP12 depleted cells (**Fig. S6**). It is known that CDK6 activity is a critical determinant of pre-RC assembly (Braden et al., 2008). Therefore, TRIP12 could control DNA replication initiation by regulating CDK6 level. The progression through the different phases of DNA replication can also be controlled by chromatin structures (Demeret et al., 2001). Our data showed that TRIP12 IDR has the capacity to modify the chromatin structure (**Fig. S3H**). It is also reported that TRIP12 associates with chromatin remodeling complex components (Cao et al., 2014; Keppler and Archer, 2010; Oliviero et al., 2016). By modifying the structure of chromatin, TRIP12 could regulate S phase progression. In summary, it is likely that TRIP12 controls the duration of DNA replication by multiple complex mechanisms. Their complete discovery will require further investigations.

Our results strongly suggest that in addition to its role for the entry into mitosis, TRIP12 exerts other functions during the progression of mitosis. The interaction of TRIP12 on chromosomes could participate in regulating the kinetics of chromosome condensation or act as a competitor to other chromatin-interacting proteins. The identification of TRIP12 as a potential substrate of CDK1 could also support its role in chromosome condensation. Indeed, it is known that CDK1 substrates, such as CAP-D3 (Chromosome associated protein-D3), are implicated in this process (Abe et al., 2011; Petrone et al., 2016). Moreover, histone ubiquitination varies during cell cycle progression. Both histones H2A and H2B are ubiquitinated in S and G₂ phases, deubiquitinated in prophase and then reubiquitinated in anaphase (Wu et al., 1981). Also, promoter of certain active genes remains ubiquitinated during the entire mitosis to facilitate their transcriptional reactivation in post-mitosis (Arora et al., 2012). Although the ubiquitin ligase RNF20 is associated to genome ubiquitination, potentially TRIP12 also participates in this epigenetic modification of histones during mitosis.

Finally, our findings show that TRIP12 is localized and sequestered in the nucleus for a short duration. This strict temporal control may act to limit the period during which TRIP12 can exert its

nuclear functions, precisely from S to early G₁. This is of particular importance for the TRIP12 inhibitory function on the DDR by promoting RNF168 degradation (Gudjonsson et al., 2012). DDR is repressed during mitosis (Giunta et al., 2010) and reactivated in G₁ phase to repair DNA damages that pass the G₂/M checkpoint or created during mitosis. Given its inhibitory role on DDR and nuclear localization during the cell cycle, TRIP12 could participate in mechanisms of DDR inhibition during mitosis by interacting with chromatin and therefore by preventing chromatin accessibility to RNF168. In contrast, TRIP12 disappearance of the nucleus in G₁ phase could be part of DDR reactivation in the cell cycle.

In summary, we provide in this study important findings on TRIP12 regulation and its implication in cell cycle progression. More importantly, we reveal for the first time its ability to interact with specific regions of the genome which can prefigure a critical role in the organization and the expression of the genome.

MATERIALS AND METHODS.

Cell culture and treatment.

HelaS3 cells, HEK-293FT, HelaS3 H2B-dsRed were grown in DMEM 4.5g/L glucose medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), L-glutamine and antibiotics (Life Technologies) at 37°C in humid atmosphere with 5% CO₂. HelaS3 and HEK-293FT were obtained from the American Type Culture Collection. The HelaS3 H2B-dsRed cell line was generated in the laboratory (see below). For serum starvation, HelaS3 cells were seeded at 80% of confluency and cultured in DMEM 4.5g/L glucose medium supplemented with 0.5% FCS for 72h. For double thymidine block, HelaS3 cells were grown in the presence of 2 mM thymidine (Sigma-Aldrich) for 18h, then in fresh medium for 8h and further grown with thymidine for another 18h. Treatments are as follows: HelaS3 cells were cultured in the presence of 2 mM thymidine for 18h, then in fresh medium for 5h and treated with 100 ng/mL nocodazole (Sigma-Aldrich) for 5h. HelaS3 cells were treated with 9 μ M Ro-3306 (Tocris Bioscience) for 20h; or, cells were treated with 500 nM reversine (Sigma-Aldrich) for 2h. HeLaS3 cells were treated with 10 μ M EDU for 15 min. The EDU incorporation was visualized using the Click-It™ EdU Alexa Fluor™ 647 Imaging kit (Life Technologies). The human pancreatic hPNE hTERT cell line was obtained from Dr M. Ouellette (University of Nebraska Medical Center, NE) and grown in DMEM 75% (Life Technologies)/M3 25% (InCell Biotech) medium supplemented with 10% FCS, L-glutamine and antibiotics (Life Technologies), 15 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich) and 750 mg/ml puromycin. The human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and Capan-2 were obtained from the American Type Culture Collection and grown in RPMI medium supplemented with 10% FCS, L-glutamine and antibiotics (Life Technologies) at 37°C in humid atmosphere with 5% CO₂.

Plasmids and transfection.

The following lentivirus shRNA lentiviral plasmids were purchased from Sigma-Aldrich: pLKO1-TRC1 non mammalian shRNA control SHC002-target sequence CAACAAGATGAAGAGCACCAA, ShTRIP12#1 pLKO1-TRC1 TRCN0000022374-target sequence CCTGAGTCAAGGAAACATGTT, ShTRIP12#2 pLKO1-TRC1 TRCN0000022375-target sequence CCGGAGTTTGAATCCACCTTT and ShTRIP12#3 pLKO1-TRC1 TRCN00000273210-target sequence CCACTACTCAGTCACCTAAAT. HelaS3 cells stably over-expressing histone H2B-dsRed fusion protein were generated after transient transfection of pcDNA₃/H2B-dsRed plasmid (kind gift from V. Lobjois, Advanced Technology Institute in Life Sciences of Toulouse, France) and selection with hygromycin (800 μ g/mL). pENTA0045 plasmid containing TRIP12 cDNA (KIAA0045) was obtained from the Kasuka DNA Research Institute (Japan) (Nakajima et al., 2005). TRIP12-GFP expressing vector was obtained by transferring TRIP12 cDNA into pCDNA™6.2/C-EmGFP-DEST vector (Life Technologies). TRIP12-GFP deletion constructs were generated by PCR amplification (Primers are listed in Supplemental Materials and Methods Table 1) followed by insertion into pDONR-201 or pDONR-221 (Life Technologies) using Gateway strategy. The different fragments were subsequently inserted in frame into pCDNA™6.2/C-EmGFP-DEST vector (Life Technologies) using the same strategy. Catalytically inactive TRIP12-GFP C1959A mutant was generated using Quik Change XL Site-Directed mutagenesis kit (Stratagene) and primers listed in Supplemental Materials and Methods Table 1. All plasmid sequences were verified by automatic sequencing. Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT)-GFP expressing vector pCDNA™6.2/C-EmGFP/GW/CAT was purchased from Life Technologies and used as control. Histone H2B (H2B)-GFP expressing plasmid was a gift from D Llères Genetics of Montpellier, France). pSG5-HAX2-FLAG-TRIP12 plasmid was generated by PCR

amplification (Primers are listed in Supplemental Materials and Methods Table 1) followed by insertion into the *Kpn* I and *EcoR* V sites of pcDNA₃ plasmid containing two HA tags, a TEV protease cleavage site and a FLAG motif upstream of the *Kpn* I site. TRIP12 cDNA fragment (1-325) and (446-1000) cloned in pDONR-201 were transferred in pET-60-DEST plasmid (Novagen) by Gateway strategy to generate GST-IDR(1-325) and GST-ARM-WWE(446-1000) plasmids. The different plasmids were transiently transfected in HeLaS3 cells using JetPEI™ reagent (PolyPlus-Transfection) following manufacturer's recommendations with a N/P ratio of 5 or 10.

Lentiviral vector production and cell transduction.

All replication defective, self-inactivating lentiviral vectors were generated in a BSL-3 facility (Vectorology platform, INSERM U1037, Toulouse, France) as previously described by Torrisani *et al.* (Torrisani et al., 2009). Briefly, transient transfection of HEK-293FT cells with packaging and lentiviral vector plasmids were performed using LENTI-Smart INT kit (InvivoGen) following manufacturer's recommendations. All batches were verified replicative virus-free. Lentiviral vector concentrations were quantified by p24 ELISA (Innotest, Ingen, Paris). Cells were seeded at a density of 10⁴ cells per well in a 48 well-dish. After 24h, cells were incubated with 150 ng of p24-equivalent of lentiviral vectors in the presence of protamine sulfate (4 µg/mL) for 12h. Transduced cells were selected for 3 weeks using puromycin (5 µg/mL-InvivoGen).

Subcellular fractionation and Western blot analysis.

Cell pellets were incubated in 100 µM Tris-HCl (pH 7.5), 1,5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 5 mM DTT, 0,5% NP-40®, 0,5 mM PMSF and 10 µL/mL protease inhibitor (Sigma-Aldrich). After 10 min-incubation on ice, samples were centrifuged (15 min at 2 000 rpm, 4°C). Supernatants containing cytosolic proteins were kept. After two washes, pellets were resuspended in RIPA (Radio-ImmunoPrecipitation Assay) buffer (Biotech) and centrifuged (20 min at 12 000rpm, 4°C), supernatants containing nuclear proteins were kept. The residual pellets were solubilized in RIPA buffer supplemented with 25 U micrococcal nuclease (Takara) and 1 mM DTT. After 20 min-incubation at 37°C, the reaction was stopped using EDTA solution (44 mM final concentration). After sonication (2 cycles of 6 s, amplitude 40% with Vibra-Cell™ sonicator), samples were centrifuged (15 min at 12 000 rpm, 4°C). Supernatants containing chromatin fraction were kept. For total protein, cell pellets were incubated in RIPA buffer supplemented with 10 µL/mL protease inhibitor (Sigma-Aldrich). After 15 min on ice, samples are centrifuged (15 min-12 000rpm, 4°C). Protein fractions were denaturated in Laemmli buffer after heating at 95°C for 5 min. Proteins were separated by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and transferred onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using TransBlot Turbo (Bio-Rad) apparatus. After membrane saturation and primary/secondary antibody incubation, protein expression was detected using Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) and Chemi-Doc™ XRS⁺ (Bio-Rad) apparatus. Signal intensities were quantified using Image Lab (Bio-Rad) software. Antibodies and dilution used for these experiments are listed in Supplemental Materials and Methods Table 2.

Flow cytometry.

For cell cycle analyses, cells were fixed in 70% ethanol during the exponential growth phase for asynchronous HeLaS3 cells or after treatment for enriched HeLaS3 cell populations. Fixed cells were treated with RNase A (10 µg/mL) and propidium iodide (20 µg/mL) (Sigma-Aldrich) for 15 min at 37°C. TRIP12(1-1992)-GFP and H2B-GFP transfected cells were fixed with ethanol 70% and incubated with a

pHH3-Ser10 antibody followed by Alexa Fluor® 555 anti-mouse secondary antibody. Data were acquired using the MACS Quant® VYB cytometer (Miltenyi Biotech) and analyzed with MACS Quant and ModFit software. Antibodies and dilution used for these experiments are listed in Supplemental Materials and Methods Table 2.

Cell proliferation.

TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells were seeded in triplicate at a concentration of $5 \cdot 10^4$ /well of 6 well-plate. After 24h (t=0), cells were counted using a Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). Cells were subsequently counted after 24h, 48h and 72h.

In vivo experiments.

Experimental procedures performed on mice were approved by the ethical committee of INSERM CREFRE animal facility and authorized by the French Ministry of Research: APAFIS#3600-2015121608386111v3. TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells ($1 \cdot 10^6$ cells) were subcutaneously injected into SCID mice (n=5). After 5 weeks, mice were euthanized and tumor volume was determined.

RNA extraction and RT-qPCR.

Total RNA was isolated from HeLaS3 cell lines with TRIzol® Reagent (Life Technologies) according to supplier's instructions. One to five µg of total RNA were reverse transcribed into cDNA using RevertAid H minus Reverse Transcriptase kit (Thermo-Scientific) according to manufacturer's recommendations. Duplicate RT-qPCR assays were carried out in a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with SsoFast™ EvaGreen® supermix (Bio-Rad) and specific primers (see primers listed in Supplemental Materials and Methods 2). Relative quantity of mRNA was calculated by the comparative threshold cycle (CT) method as $2^{-\Delta CT}$, where $\Delta CT = CT_{Trip12 \text{ mRNA}} - CT_{Reference \text{ mRNA}}$. Three mRNAs of reference (*β-Actin*, *Gapdh* and *cyclophilin A*) were used for normalization. Primers are listed in Supplemental Materials and Methods Table 1.

Chromosome spreading.

Cells were treated with 9 µM Ro-3306 for 20h, washed with PBS and released in fresh medium for 45 min at 37°C, or in medium supplemented with 100 µM nocodazole for 4h. Mitotic cells were collected by brief treatment with trypsin, rinsed with PBS and swollen in hypotonic medium (10 mM KCl, 15% FCS) at 37°C for 20 min. Cell preparations were fixed with a freshly made 75% ethanol, 25 % glacial acetic acid solution overnight at 4°C, dropped on glass slides and air-dried. Slides were stained with DAPI or processed for immunofluorescence (see below).

Naked DNA interaction.

GST-IDR(1-325) and GST-WWE-ARM(446-1000) recombinant proteins were purified from BL21 bacteria and quantified. Increasing volumes of purified proteins were incubated with 100 ng of pENTR1A-GFP plasmid (made in laboratory) in Tris-HCl (pH 7.6) 10 mM-EDTA 1 mM buffer for 20 min at room temperature. Reactions were migrated on agarose gel 0.7% and visualized with ethidium bromide.

Immunofluorescence.

Cells were grown on cover slips then subsequently fixed and permeabilized using with IntraStain™ reagent (DAKO) or methanol/0.1% Triton™ X-100. Cover slips were saturated using Protein block™ reagent (DAKO) for 30 min and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C. After several washes, cells were incubated with appropriate secondary Alexa Fluor®-488 anti-mouse, Alexa Fluor®-555 anti-mouse or Alexa Fluor®-555 anti-rabbit antibodies for 2h at room temperature. Nuclei were counterstained with 1 µM DAPI for 5 min at room temperature. Cover slips were mounted on glass slides using Fluorescent Mounting Reagent/Medium (DAKO). Fluorescence was visualized using LSM 780 or 880 confocal microscope (Zeiss) with a 63x NA 1.4 oil-immersion objective and analyzed using Zen software (Zeiss). Antibodies and dilution used for these experiments are listed in Supplemental Materials and Methods Table 2.

Bioinformatic prediction of intrinsically disordered regions.

Detection of intrinsically disordered region in TRIP12 protein sequence (NP_004229.1) was determined using the prediction software IUPred (iupred.enzim.hu)(Dosztányi et al., 2005), GlobPlot (<http://globplot.embl.de/>)(Linding et al., 2003a) and DisEMBL (dis.embl.de)(Linding et al., 2003b).

Live cell microscopy.

H2B-dsRed HeLaS3 cells were treated with Ro-3306 and released in the cell cycle. Fluorescent images were acquired (Objective 20x) every minute for 6h using a Zeiss motorized inverted Observer Z1 microscope, containing LED module Colibri. Filter combinations: GFP (38 HE) DsRed (43 HE) and DAPI (49) with the AxioCam MRm camera system. Time-lapse imaging of living cells was performed using Pecon-Zeiss incubation system for temperature (37°C) and CO₂ (5%) controlled environment. Images were subsequently analyzed using ZEN SP2 software (Blue edition Zeiss). Transfected Ro-3306-treated HeLaS3 cells released in the cell cycle were imaged every half-hour or hour using IncuCyte Zoom Kinetic Imaging System with a 10x objective.

SWATH-MS comparative proteomic analysis.

Analysis of proteins was performed using a microLC system Ultimate 3000 (Dionex, Villebon sur Yvette, France) coupled to a Triple-TOF 5600+ (AB Sciex, Les Ulis, France) in the positive ion mode. Samples were first dissolved in 16 µL of buffer (5% ACN, 0.05% trifluoroacetic acid) and spiked with iRT calibration mix (Biognosys, Schlieren, France). The totality of the samples was then injected on a YMC-Pack Pro C18 column (3.0 mm × 150 mm; 3 µm particle size) at a flow rate of 5 µL.min⁻¹. The run length was over 90 min with a gradient from 7% to 45% buffer B (buffer A: 0.1% formic acid, buffer B: 90% ACN, and 0.1% formic acid) in 70 min. The MS data were acquired with a SWATH mode. The source parameters were set as follows: IS at 5500V, Cur gas at 25, GS1 at 5. The acquisition parameters were as follows: one 50 msec accumulation time MS scan followed by 50 variable SWATH windows each at 40 msec accumulation time for m/z 400–1250. Identification was determined using an in-house SWATH library created HeLaS3 cells with MaxQuant software, Les Ulis, France) (FDR 1%). A mass accuracy of 20ppm on precursor ions was used, and 0.5 Da on the fragments. Cysteine carbamidomethylation, methionine oxidation, proline hydroxylation and serine, threonine and tyrosine phosphorylations were taken into account. Data treatment was done with Spectronaut Software 9.0, Les Ulis, France). Analysis of ShScr and ShTRIP12#1 HeLaS3 cells was performed on three different transductions. For each peptide, a triplicate with a peptide quantity <5 and a standard error > 60 % of the mean was excluded from the analysis. For each replicate, the sum of the four most

abundant peptides was calculated. The mean of ShTRIP12 triplicate was compared to the one of ShScr triplicate. Protein with a fold change >1.2 and <0.8 compared to ShScr cells were considered.

Statistical analysis.

In vitro data were analyzed by 2-tailed, unpaired Student's t-test using a multiple statistics Graph Pad Prism 5 software package and a difference was considered significant when p value was lower than 0.05. Mean values are given \pm SEM. Number of independent experiments is indicated in the figure legends. *, ** and *** indicate a p value <0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS.

D. Larrieu was funded by the Ligue Nationale contre le Cancer and M. Brunet by the University Paul Sabatier, Toulouse, France. This project was funded by the Ligue Régionale Midi-Pyrénées contre le Cancer. The acquisition of Incucyte Zoom apparatus was funded by the Région Occitanie (#15052181).

We thank the imaging, cytometry and geno-transcriptomics platforms of the Cancer Research Center of Toulouse (CRCT) and of the Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases of Toulouse (I2MC). We thank Drs P. Soubeyran (Cancer Research Center of Marseille), F. Larminat (Institute of Pharmacology and Structural Biology of Toulouse), A. Besson, S. Manenti, JS. Hoffmann teams (CRCT) for ample scientific discussions, and D. Arvanitis (I2MC) for English proof reading of the manuscript.

REFERENCES.

- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* 25, 863–874.
- Arora, M., Zhang, J., Heine, G.F., Ozer, G., Liu, H., Huang, K., and Parvin, J.D. (2012). Promoters active in interphase are bookmarked during mitosis by ubiquitination. *Nucleic Acids Res.* 40, 10187–10202.
- Aviner, R., Shenoy, A., Elroy-Stein, O., and Geiger, T. (2015). Uncovering Hidden Layers of Cell Cycle Regulation through Integrative Multi-omic Analysis. *PLoS Genet.* 11, e1005554.
- Braden, W.A., McClendon, A.K., and Knudsen, E.S. (2008). Cyclin-dependent kinase 4/6 activity is a critical determinant of pre-replication complex assembly. *Oncogene* 27, 7083–7093.
- Bramswig, N.C., Lüdecke, H.-J., Pettersson, M., Albrecht, B., Bernier, R.A., Cremer, K., Eichler, E.E., Falkenstein, D., Gerdt, J., Jansen, S., et al. (2017). Identification of new TRIP12 variants and detailed clinical evaluation of individuals with non-syndromic intellectual disability with or without autism. *Hum. Genet.* 136, 179–192.
- Cai, J.-B., Shi, G.-M., Dong, Z.-R., Ke, A.-W., Ma, H.-H., Gao, Q., Shen, Z.-Z., Huang, X.-Y., Chen, H., Yu, D.-D., et al. (2015). Ubiquitin-specific protease 7 accelerates p14(ARF) degradation by deubiquitinating thyroid hormone receptor-interacting protein 12 and promotes hepatocellular carcinoma progression. *Hepatol. Baltim. Md* 61, 1603–1614.
- Cao, Q., Wang, X., Zhao, M., Yang, R., Malik, R., Qiao, Y., Poliakov, A., Yocum, A.K., Li, Y., Chen, W., et al. (2014). The central role of EED in the orchestration of polycomb group complexes. *Nat. Commun.* 5, 3127.
- Chen, D., Shan, J., Zhu, W.-G., Qin, J., and Gu, W. (2010). Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature* 464, 624–627.
- Chen, D., Kon, N., Zhong, J., Zhang, P., Yu, L., and Gu, W. (2013). Differential effects on ARF stability by normal versus oncogenic levels of c-Myc expression. *Mol. Cell* 51, 46–56.
- Chen, W., Smeekeens, J.M., and Wu, R. (2016). Systematic study of the dynamics and half-lives of newly synthesized proteins in human cells. *Chem. Sci.* 7, 1393–1400.
- Coverley, D., Laman, H., and Laskey, R.A. (2002). Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat. Cell Biol.* 4, 523–528.
- Crasta, K., Ganem, N.J., Dagher, R., Lantermann, A.B., Ivanova, E.V., Pan, Y., Nezi, L., Protopopov, A., Chowdhury, D., and Pellman, D. (2012). DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 482, 53–58.
- De Boer, L., Oakes, V., Beamish, H., Giles, N., Stevens, F., Somodevilla-Torres, M., DeSouza, C., and Gabrielli, B. (2008). Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene* 27, 4261–4268.

- Demeret, C., Vassetzky, Y., and Méchali, M. (2001). Chromatin remodelling and DNA replication: from nucleosomes to loop domains. *Oncogene* 20, 3086–3093.
- Dobson, T., Chen, J., and Krushel, L.A. (2013). Dysregulating IRES-Dependent Translation Contributes to Overexpression of Oncogenic Aurora A Kinase. *Mol. Cancer Res.* 11, 887–900.
- Dosztányi, Z., Csizmók, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J. Mol. Biol.* 347, 827–839.
- Dunphy, W.G., Brizuela, L., Beach, D., and Newport, J. (1988). The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54, 423–431.
- Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 197–208.
- den Elzen, N., and Pines, J. (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J. Cell Biol.* 153, 121–136.
- Enders, G.H. (2010). Gauchos and ochos: a Wee1-Cdk tango regulating mitotic entry. *Cell Div.* 5, 12.
- Ganem, N.J., and Pellman, D. (2012). Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J. Cell Biol.* 199, 871–881.
- Giunta, S., Belotserkovskaya, R., and Jackson, S.P. (2010). DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J. Cell Biol.* 190, 197–207.
- Gudjonsson, T., Altmeyer, M., Savic, V., Toledo, L., Dinant, C., Grøfte, M., Bartkova, J., Poulsen, M., Oka, Y., Bekker-Jensen, S., et al. (2012). TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* 150, 697–709.
- Hanoun, N., Fritsch, S., Gayet, O., Gigoux, V., Cordelier, P., Duseti, N., Torrisani, J., and Dufresne, M. (2014). The E3 ubiquitin ligase thyroid hormone receptor-interacting protein 12 targets pancreas transcription factor 1a for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 289, 35593–35604.
- Ju, D., Wang, X., Xu, H., and Xie, Y. (2007). The armadillo repeats of the Ufd4 ubiquitin ligase recognize ubiquitin-fusion proteins. *FEBS Lett.* 581, 265–270.
- Kajiro, M., Tsuchiya, M., Kawabe, Y.-I., Furumai, R., Iwasaki, N., Hayashi, Y., Katano, M., Nakajima, Y., Goto, N., Watanabe, T., et al. (2011). The E3 ubiquitin ligase activity of Trip12 is essential for mouse embryogenesis. *PloS One* 6, e25871.
- Keppler, B.R., and Archer, T.K. (2010). Ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent control of subunit stoichiometry in the SWI/SNF complex. *J. Biol. Chem.* 285, 35665–35674.
- Krois, A.S., Ferreón, J.C., Martínez-Yamout, M.A., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2016). Recognition of the disordered p53 transactivation domain by the transcriptional adapter zinc finger domains of CREB-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E1853-1862.

- Kweon, S.-M., Chen, Y., Moon, E., Kvederaviciutė, K., Klimasauskas, S., and Feldman, D.E. (2019). An Adversarial DNA N6-Methyladenine-Sensor Network Preserves Polycomb Silencing. *Mol. Cell*.
- Lau, Y.F., and Arrighi, F.E. (1981). Studies of mammalian chromosome replication. II. Evidence for the existence of defined chromosome replicating units. *Chromosoma* **83**, 721–741.
- van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R.J., Daughdrill, G.W., Dunker, A.K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D.T., et al. (2014). Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **114**, 6589–6631.
- Li, C., Andrade, M., Dunbrack, R., and Enders, G.H. (2010). A bifunctional regulatory element in human somatic Wee1 mediates cyclin A/Cdk2 binding and Crm1-dependent nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 116–130.
- Linding, R., Russell, R.B., Neduva, V., and Gibson, T.J. (2003a). GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3701–3708.
- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., and Russell, R.B. (2003b). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **11**, 1453–1459.
- Lindqvist, A., van Zon, W., Karlsson Rosenthal, C., and Wolthuis, R.M.F. (2007). Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. *PLoS Biol.* **5**, e123.
- Ma, H., Chen, H., Guo, X., Wang, Z., Sowa, M.E., Zheng, L., Hu, S., Zeng, P., Guo, R., Diao, J., et al. (2012). M phase phosphorylation of the epigenetic regulator UHRF1 regulates its physical association with the deubiquitylase USP7 and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4828–4833.
- Maréchal, A., Li, J.-M., Ji, X.Y., Wu, C.-S., Yazinski, S.A., Nguyen, H.D., Liu, S., Jiménez, A.E., Jin, J., and Zou, L. (2014). PRP19 transforms into a sensor of RPA-ssDNA after DNA damage and drives ATR activation via a ubiquitin-mediated circuitry. *Mol. Cell* **53**, 235–246.
- McLean, J.R., Chaix, D., Ohi, M.D., and Gould, K.L. (2011). State of the APC/C: organization, function, and structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 118–136.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 379–393.
- Nakajima, D., Saito, K., Yamakawa, H., Kikuno, R.F., Nakayama, M., Ohara, R., Okazaki, N., Koga, H., Nagase, T., and Ohara, O. (2005). Preparation of a set of expression-ready clones of mammalian long cDNAs encoding large proteins by the ORF trap cloning method. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* **12**, 257–267.
- Oliviero, G., Brien, G.L., Waston, A., Streubel, G., Jerman, E., Andrews, D., Doyle, B., Munawar, N., Wynne, K., Crean, J., et al. (2016). Dynamic Protein Interactions of the Polycomb Repressive Complex 2 during Differentiation of Pluripotent Cells. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **15**, 3450–3460.
- O’Roak, B.J., Stessman, H.A., Boyle, E.A., Witherspoon, K.T., Martin, B., Lee, C., Vives, L., Baker, C., Hiatt, J.B., Nickerson, D.A., et al. (2014). Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat. Commun.* **5**, 5595.

- Park, Y., Yoon, S.K., and Yoon, J.-B. (2008). TRIP12 functions as an E3 ubiquitin ligase of APP-BP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 294–298.
- Parker, L.L., and Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 257, 1955–1957.
- Peng, Z., and Kurgan, L. (2015). High-throughput prediction of RNA, DNA and protein binding regions mediated by intrinsic disorder. *Nucleic Acids Res.* 43, e121.
- Pesin, J.A., and Orr-Weaver, T.L. (2008). Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 475–499.
- Petrone, A., Adamo, M.E., Cheng, C., and Kettenbach, A.N. (2016). Identification of Candidate Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 15, 2448–2461.
- Pines, J., and Hunter, T. (1989). Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* 58, 833–846.
- Sabari, B.R., Dall’Agnese, A., Boija, A., Klein, I.A., Coffey, E.L., Shrinivas, K., Abraham, B.J., Hannett, N.M., Zamudio, A.V., Manteiga, J.C., et al. (2018). Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* 361.
- Siddiqui, K., On, K.F., and Diffley, J.F.X. (2013). Regulating DNA replication in eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Torrisani, J., Bournet, B., du Rieu, M.C., Bouisson, M., Souque, A., Escourrou, J., Buscail, L., and Cordelier, P. (2009). let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum Gene Ther* 20, 831–844.
- Wang, C., Uversky, V.N., and Kurgan, L. (2016). Disordered nucleome: Abundance of intrinsic disorder in the DNA- and RNA-binding proteins in 1121 species from Eukaryota, Bacteria and Archaea. *Proteomics* 16, 1486–1498.
- Wang, L., Zhang, P., Molkentine, D.P., Chen, C., Molkentine, J.M., Piao, H., Raju, U., Zhang, J., Valdecanas, D.R., Taylor, R.C., et al. (2017). TRIP12 as a mediator of human papillomavirus/p16-related radiation enhancement effects. *Oncogene* 36, 820–828.
- Whitfield, M.L., Sherlock, G., Saldanha, A.J., Murray, J.I., Ball, C.A., Alexander, K.E., Matese, J.C., Perou, C.M., Hurt, M.M., Brown, P.O., et al. (2002). Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. *Mol. Biol. Cell* 13, 1977–2000.
- Wu, R.S., Kohn, K.W., and Bonner, W.M. (1981). Metabolism of ubiquitinated histones. *J. Biol. Chem.* 256, 5916–5920.

SUPPLEMENTAL MATERIAL AND METHODS.

Table 1: List of primers.

For RT-qPCR.

Trip12 Forward: 5'-TTCAGATTGGTGGACCTTCC-3'; Reverse: 5'-GGCTACAACCTGGGTCGATGT-3'

Cyclin B1 Forward: 5'-CAAGCCCAATGGAAACATCTG-3'; Reverse: 5'-TTGCTCTTCTCAAGTTGTCTC-3'

Gapdh Forward: 5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'; Reverse: 5'-GTAAGTCTGCTCTGGAAAGATG-3'

β-Actin Forward: 5'-AGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGT-3'; Reverse: 5'-GCAATCAAAGTCCTCGGCC hACATT-3'

Cyclophilin A Forward: 5'-GTCAACCCACCGTGTCTT-3'; Reverse: 5'-CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT-3'

For deletion constructs.

TRIP12(1-1992)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTCCAACC GGCCTAATAAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTAGGAAAGATGGAACGACTG-3'

TRIP12(1-1552)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTCCAACC GGCCTAATAAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTAATAAAAAAGCATTGCGGGGTATCA AAAGG-3'

TRIP12(1-445)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTCCAACC GGCCTAATAAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTATCCTTGTAGTAGCTGCTGGGC-3'

TRIP12(446-1551)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTTGC AAGCCAGTGATGAAAGT-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTAATAAAAAAGCATTGCGC GGTATCAAAAGG-3'

TRIP12(1553-1992)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGT AACTGCATTTGATCGGGAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTAGGAAAGATGGAACG ACTG-3'

TRIP12(446-1000)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTTGC AAGCCAGTGATGAAAGT-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTATAGAACATCACTTAATCG-3'

TRIP12(1000-1552)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAAGAGA AAACGACTGCCAAA-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTAATAAAAAAGCATTGCGGGGTAT CAAAAGG-3'

TRIP12(1-325)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTCCAACCGG CCTAATAAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTAGCGTGTGCTCCGCTC-3'

TRIP12(107-445)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCCACATA GTAAGTCAAAGAAGAGAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTATCCTTGTAGTAGCTGCTG GGC-3'

TRIP12(1-218)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTCCAACCGG CCTAATAAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTATGGTGGTACAGTGGAGGAG-3'

TRIP12(107-325)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCCACATA GTAAGTCAAAGAAGAGAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTAGCGTGTGCTCCGCTC-3'

TRIP12(219-445)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGGTGCC AGAGTGAAACAAGG-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTATCCTTGTAGTAGCTGCTGGGC-3'

TRIP12(1-106)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTCCAACCGG CCTAATAAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTACTTATTTGTTCTGAGGGAGATTGAG-3'

TRIP12(107-218)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCCACA TAGTAAGTCAAAGAAGAGAC-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTATGGTGGTACAGTGGA GGAG-3'

TRIP12(219-325)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGG TGCCAGAGTGAAACAAGG-3'; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTAGCGTGTGCTCCGCTC-3'

TRIP12(326-445)-GFP Forward: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCAAAAAG CACCGGCTCC; Reverse: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTATCCTTGTAGTAGCTGCTGGGC-3'

For site-directed mutagenesis.

TRIP12(1-1992)-GFP C1959A Forward: 5'-GCCCTCTGTAATGACTGCTGTAACATCTTAAGTTGCCGG-3'; Reverse: 5'-CCGGCAACTTAAGATAGTTACAGCAGTCATTACAGAGGGC-3'

For psg5 HAx2-FLAG-TRIP12 construct Forward: 5'-ATAGGTACCATGTCCAACCGCCTAATAACAATCC-3'; Reverse: 5'-ATAGATATCTTAGGAAAGATGGAACGACTGCTGCCC-3'

Table 2: List of antibodies and peptides.

Proteins	Primary antibodies	Dilution (type of assay)
TRIP12	Bethyl laboratories A301-814A	1/1000 (IF and WB)
TRIP12	Sigma HPA036835	1/1000 (IF)
CYCLIN B1	Millipore MAB3684	1/1000 (IF and WB)
CYCLIN A	Santa Cruz sc-751	1/1000 (IF)
CYCLIN A	GeneTex GTX634420	1/1000 (WB)
Phospho HISTONE H3 (Ser 10)	Sigma H0412	1/500 (WB)
Phospho HISTONE H3 (Ser 10)	Cell Signaling 9706	1/1000 (IF and FACS)
GAPDH	Santa Cruz sc-25778	1/2000 (WB)
γ -TUBULIN	Abcam Ab27074 [Tu30]	1/500 (IF)
GFP	Santa Cruz sc-9996	1/200 (IF)
4EBP1	Cell Signaling 9644	1/5000 (WB)
SP1	Santa Cruz sc-59	1/500 (WB)
panH3	Upstate 07-690	1/6000 (WB)
WEE1	Cell Signaling 4936	1/1000 (WB)
CDC25C	Santa Cruz 327	1/1000 (WB)
Phospho CDK1 (Tyr15)	Cell Signaling 9111	1/2000 (WB)
CDK1	Cell Signaling 28439	1/1000 (WB)
HA-tag	Cell Signaling 3724	1/500 (IF)
CDK6	Santa Cruz sc-177	1/1000 (WB)

Secondary antibodies:

Alexa-Fluor®555 anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies (Life Technologies). Dilution IF:1/1000.

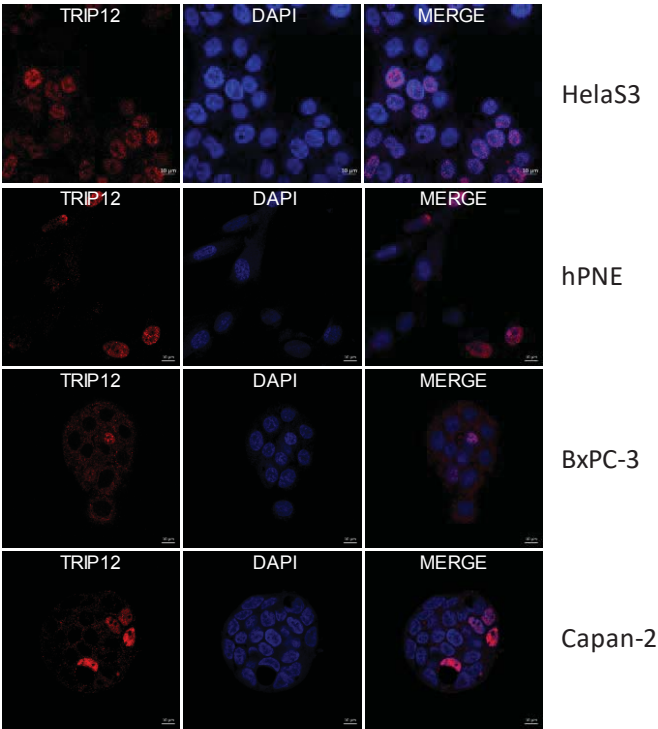
Alexa-Fluor®488 anti-mouse secondary antibody (Life Technologies). Dilution IF: 1/1000 and dilution FACS: 1/200.

Peptides:

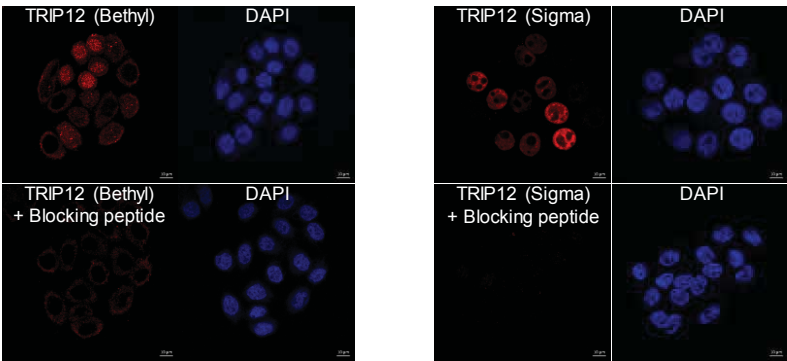
Recombinant protein fragment of human TRIP12 (PrEST Antigen TRIP12 #APrEST79147).

TRIP12 blocking peptide (Bethyl Laboratories #BP301-814).

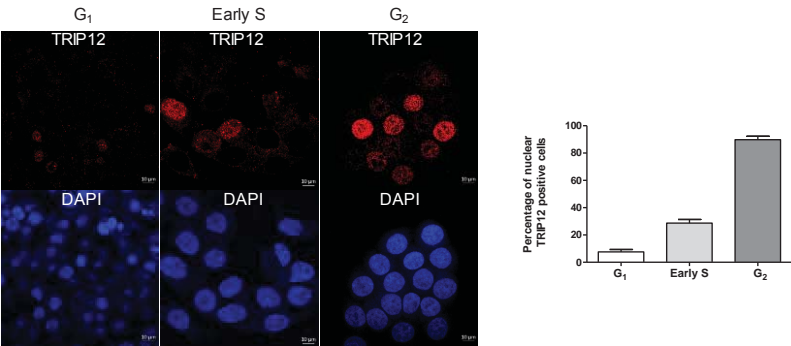
A



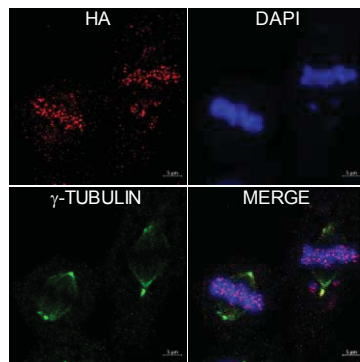
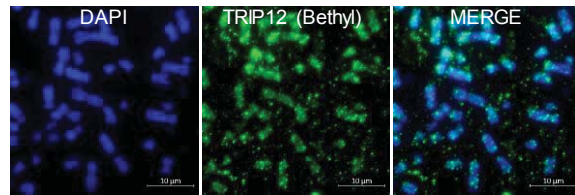
B



C

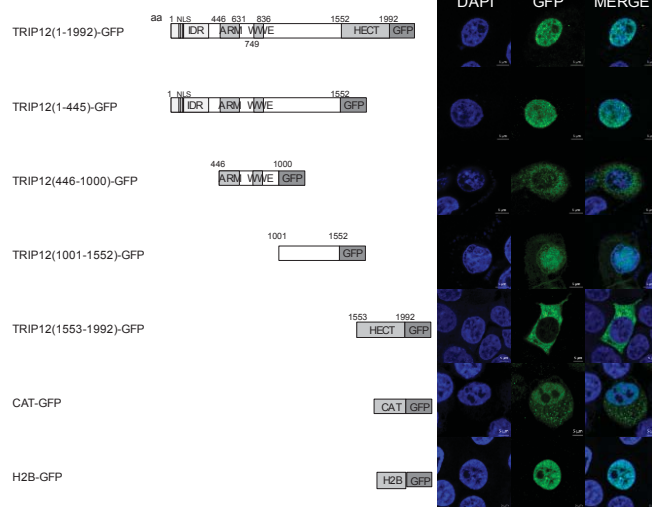


Supplemental Figure 1. A- TRIP12 localization in HeLaS3, hPNE, BxPC-3 and Capan-2 cells was determined by immunofluorescence with anti-TRIP12 antibody (Bethyl). Nuclei were counterstained with DAPI. B- Specificity of anti-TRIP12 antibodies was assessed by immunofluorescence. HeLaS3 cells were immuno-stained using anti-TRIP12 Bethyl and Sigma antibodies in presence or not of corresponding blocking peptide (in 50X excess). Nuclei were counterstained with DAPI. The cytosolic staining with Bethyl antibody corresponds to a non-specific staining. C- TRIP12 subcellular localization in G₁, early S and G₂-enriched HeLaS3 cell populations was determined by immunofluorescence using TRIP12 antibody (Bethyl). Nuclei were counterstained with DAPI. Results are expressed as percentage of cells \pm SEM obtained from a minimum of 400 cells in three independent experiments.

A**B****Supplemental Figure 2**

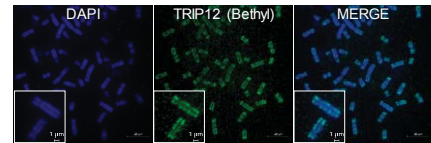
Supplemental Figure 2. **A-** TRIP12 localization in HeLaS3 cells in metaphase transfected with HA-TRIP12 construct was visualized by immunofluorescence using anti-HA antibody. An anti- γ -TUBULIN antibody was used as a spindle marker. Nuclei were counterstained with DAPI. **B-** TRIP12 localization on metaphasic chromosomes was visualized by immunofluorescence using anti-TRIP12 antibody (Bethyl) after chromosome spreading of HeLaS3 cells treated with Ro-3306 and released in the cell cycle for 45 min. DNA was counterstained with DAPI.

A

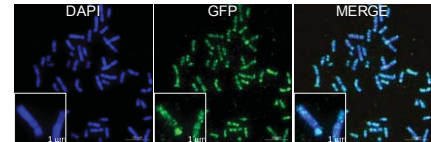


B

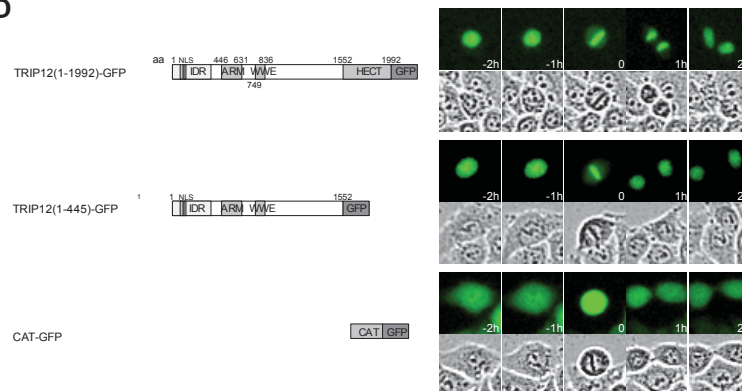
Supplemental Figure 3



C

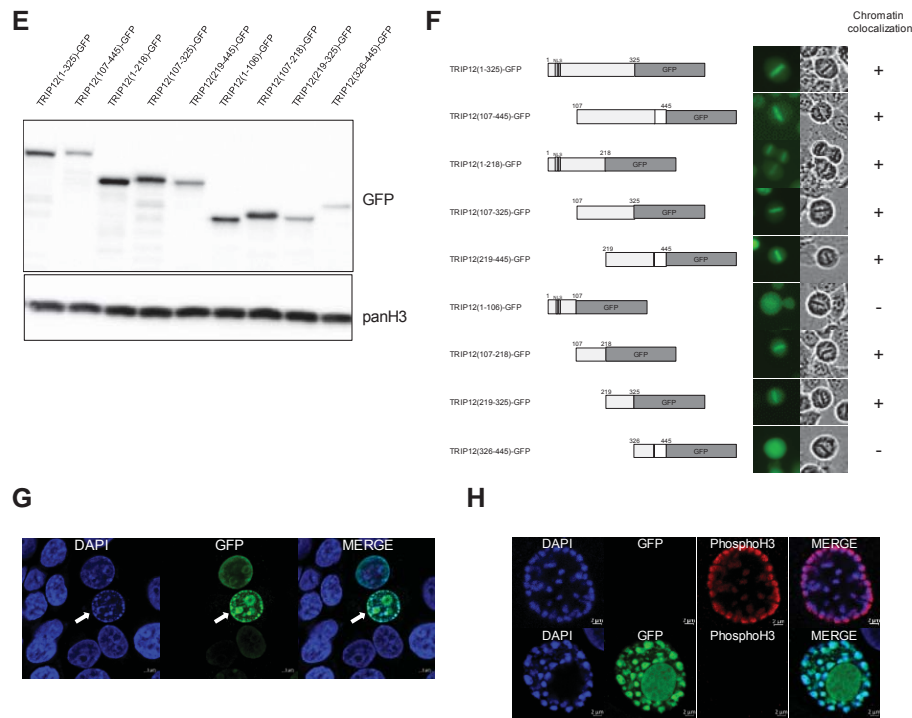


D

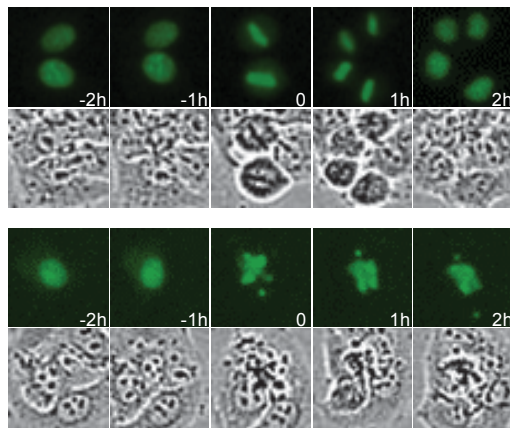
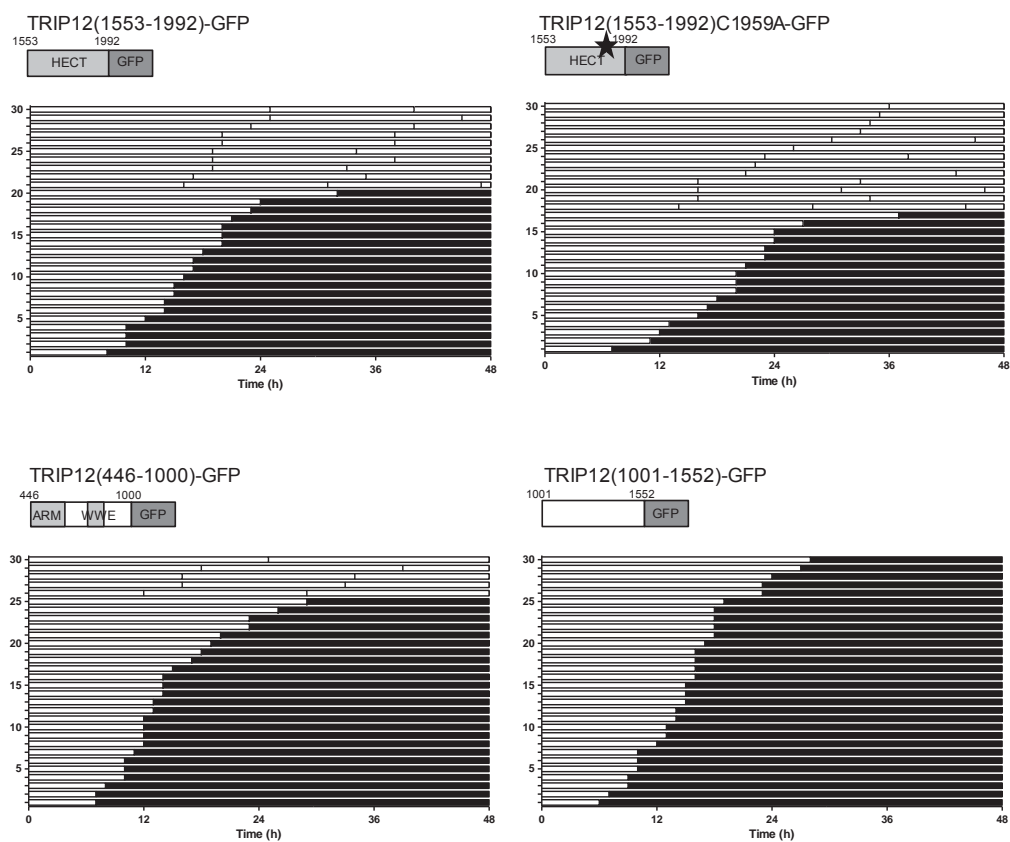


Supplemental Figure 3. **A-** GFP-fusion protein localization in interphasic HeLaS3 cells transfected with TRIP12 (1-1992), (1-445), (446-1000), (1001-1552) and (1553-1992)-GFP constructs was analyzed by immunofluorescence using an anti-GFP antibody. H2B-GFP and CAT-GFP constructs were used as controls. Nuclei were counterstained with DAPI. IDR stands for Intrinsically Disordered Region, ARM for b-Armadillo domain, WWE for tryptophan and glutamate enriched domain and HECT for Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus. Numbers indicate amino acids (aa) position. **B-** TRIP12(1-445)-GFP on metaphasic chromosome arms was visualized by immunofluorescence using anti-TRIP12 antibody (Bethyl) after chromosome spreading of HeLaS3 cells transfected with TRIP12(1-445)-GFP construct treated with Ro-3306 and released in the cell cycle for 45 min. DNA was counterstained with DAPI. The inset represents a magnification of TRIP12 localization on an individual chromosome. **C-** TRIP12(1-445)-GFP localization on metaphasic chromosomes was visualized by immunofluorescence using anti-GFP antibody after chromosome spreading of HeLaS3 cells transfected with TRIP12(1-445)-GFP construct treated with Ro-3306 and released in the cell cycle for 45 min. DNA was counterstained with DAPI. **D-** GFP-fusion protein localization in living HeLaS3 cells previously transfected with TRIP12(1-1992) and (1-445)-GFP constructs was followed by live cell microscopy. CAT-GFP was used as control. GFP and phase contrast cells visualization were presented 1h and 2h before and after a representative cell in metaphase.

Supplemental Figure 3

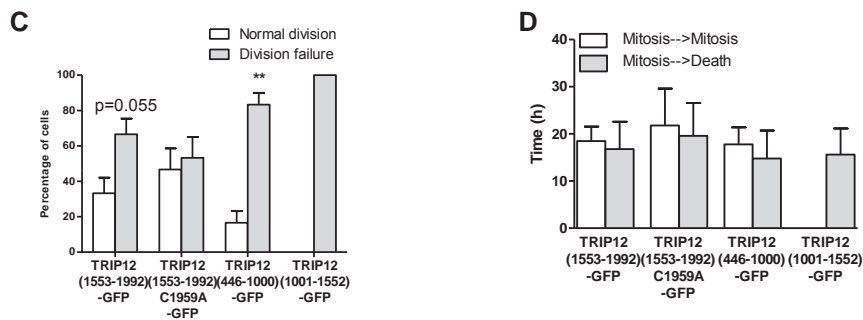


Supplemental Figure 3. **E-** TRIP12-GFP construct expression was measured by Western blot 24h after transient transfection in HeLaS3 cells. panH3 protein level was used as loading control. Images were obtained from the experiment and representative of three different experiments. **F-** GFP-fusion protein localization in living HeLaS3 cells previously transfected with a series of TRIP12-GFP constructs as indicated was followed by live cell microscopy. GFP and phase contrast cells visualization were presented in representative cells in metaphase. + and – indicate colocalization of GFP-construct with chromatin or not. **G-** GFP localization in interphasic HeLaS3 cells expressing high concentration of TRIP12(1-445)-GFP construct (white arrow) was visualized by immunofluorescence using an anti-GFP antibody. Nuclei were counterstained with DAPI. **H-** GFP and pHH3-Ser10 expression in HeLaS3 cell in prophase (top panel) or highly expressing TRIP12(1-445)-GFP construct (bottom panel) was visualized by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI.

A**B**

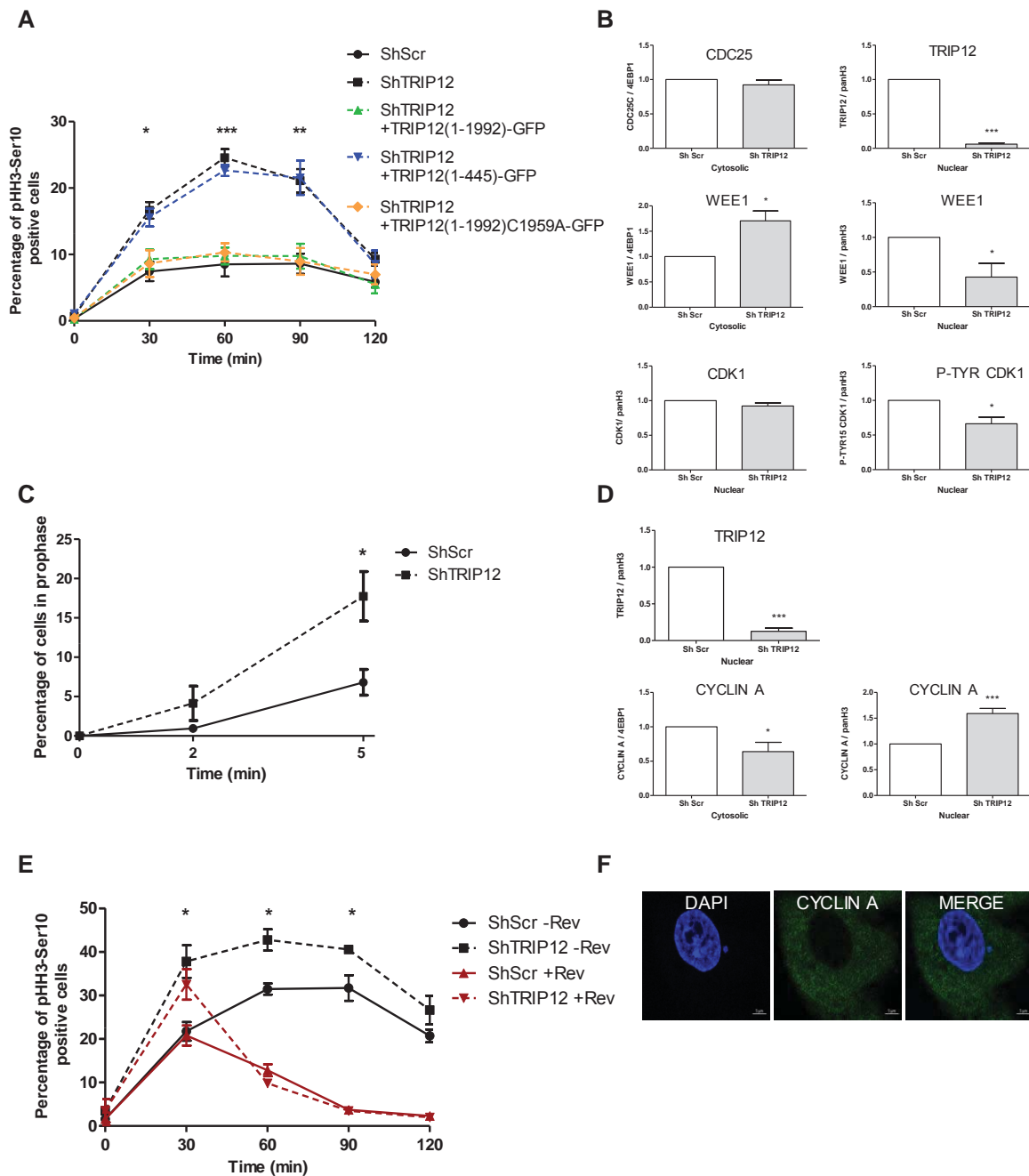
Supplemental Figure 4. A- Illustrative images of TRIP12(1-1992)-GFP transfected cells that overcome cell division (top panel) or die (bottom panel) obtained by live cell microscopy. **B-** GFP-positive HeLaS3 cells were imaged every hour for 48h after transient transfection with TRIP12(1553-1992)-GFP, TRIP12(1553-1992) C1959A-GFP, TRIP12(446-1000)-GFP, TRIP12(1001-1552)-GFP constructs. Thirty GFP-positive cells obtained from three different experiments were analyzed. Each white horizontal bar represents time spent in interphase of one cell. Each vertical bar between white bars indicates cell division. Bars in black correspond to time spent after cell death.

Supplemental Figure 4

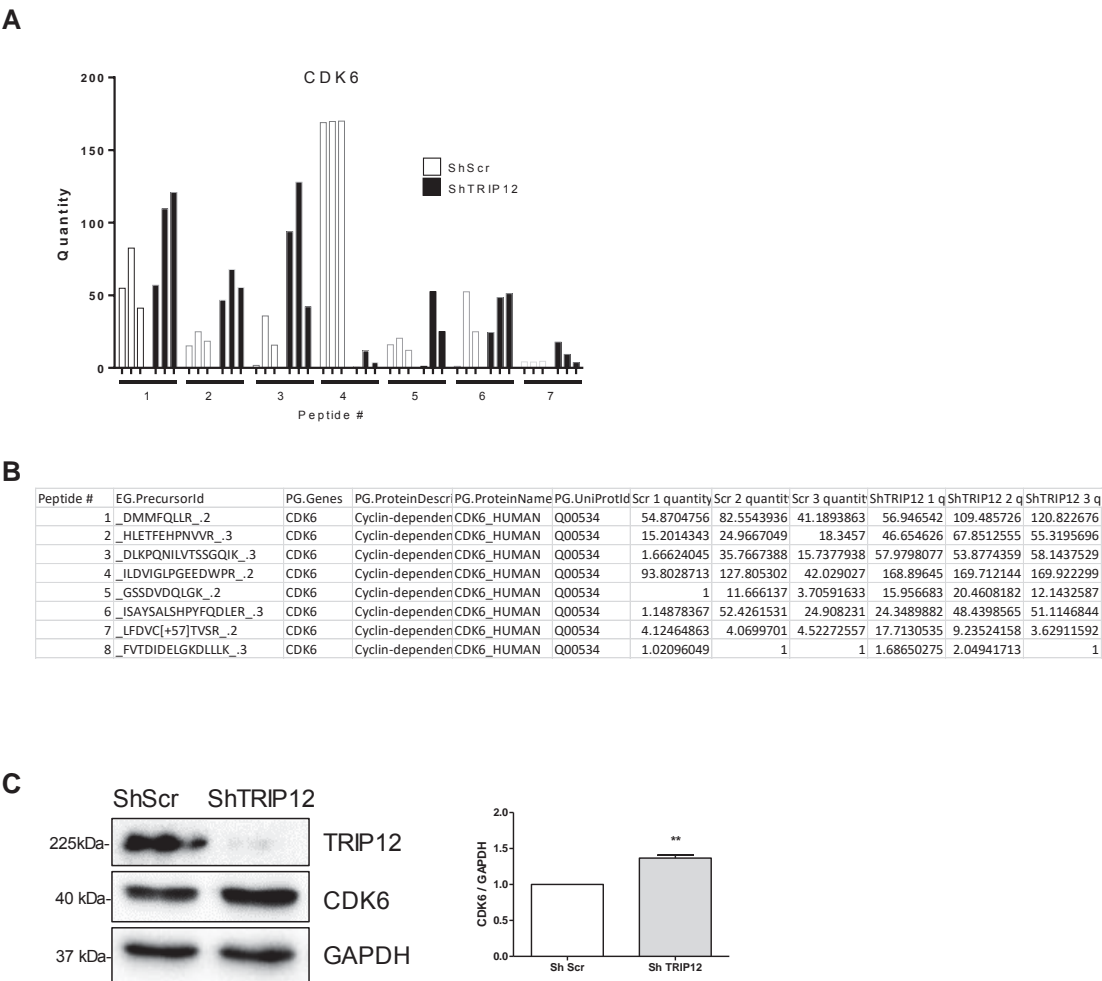


Supplemental Figure 4. **C-** The graph represents the percentage \pm SEM of GFP-cells that overcome at least two cell divisions or die over a 48h-period. ** indicates a p value < 0.01 . **D-** The graph represents the average duration \pm SEM in interphase between two mitoses (white bars) and between mitosis and cell death (grey bars) in the different GFP positive cells.

Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 5. **A-** Percentage of pHH3-Ser10 positive in TRIP12-depleted (ShTRIP12#1) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested by Ro-3306 treatment was assessed by flow cytometry after release in inhibitor free medium every 30 min for 2h. TRIP12-depleted cells were previously transfected with TRIP12(1-1992)-GFP, TRIP12(1-1992) C1959A-GFP or control TRIP12(1-445)-GFP constructs. The graph represents the mean \pm SEM of three different experiments. *, **, *** indicate a p value <0.05, <0.01 and <0.001, respectively. **B-** Quantification of TRIP12, CDC25, WEE1, P-Tyr15 CDK1 and CDK1 protein expression in cytosolic and nuclear fractions of TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells was determined by Western blot analysis. The graphs represent the mean \pm SEM of three different experiments. * and *** indicate a p value < 0.05 and 0.001, respectively. **C-** Percentage of pHH3-Ser10 positive cells in TRIP12-depleted (ShTRIP12#1) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested in G2 phase by a Ro-3306 treatment and released in the cell cycle by medium replacement was determined by flow cytometry at the indicated time. Reversine (500 nM) was added in the medium at time 0. The results represent the mean \pm SEM obtained from three different experiments. * indicates a p value < 0.05. **D-** Quantification of TRIP12 and CYCLIN A protein expression in cytosolic and nuclear fractions of TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells was determined by Western blot analysis. The graphs represent the mean \pm SEM of three different experiments. * and *** indicate a p value < 0.05 and 0.001, respectively. **E-** Percentage of cells in prophase in TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells arrested by a Ro-3306 treatment and released in the cell cycle was determined by immunofluorescence using anti-pHH3-Ser10 antibody at the indicated time. The results represent the mean \pm SEM obtained from at least 104 cells of three different experiments. * indicates a p value <0.05. **F-** CYCLIN A localization in HeLaS3 cells with micronucleus was visualized by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI.



Supplemental Figure 6. A- Quantification of 7 peptides corresponding to CDK6 protein in TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells was determined by SWATH-MS analysis (Supplemental Materials and Methods). Each bar represents a biological replicate. **B-** Raw data corresponding to CDK6 peptides identified by SWATH-MS. **C-** CDK6 expression in TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells was determined by Western blot analysis. The GAPDH protein level was used as loading control. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. The graph represents the mean expression of CDK6 \pm SEM. ** indicates a p value <0.01 .

DISCUSSION

A ce jour, la protéine TRIP2 a principalement été décrite dans la littérature comme l'E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de facteurs importants dans la réponse aux dommages à l'ADN, le remodelage de la chromatine et l'activation de la voie de signalisation p53. L'ensemble de ces processus sont finement régulés au cours du cycle cellulaire. Néanmoins, la régulation de l'expression et les étapes du cycle cellulaire dans lesquelles TRIP12 exerce une (des) fonction(s) n'ont jamais été décrites.

Au cours de ma thèse j'ai démontré que TRIP12 est une protéine nucléaire dont l'expression varie au cours du cycle cellulaire. Absente en phase G₁, son expression commence en début de phase S pour atteindre une expression maximale en mitose. De plus, j'ai identifié un domaine fonctionnel dans la partie N-terminale de TRIP12 qui lui confère une forte affinité pour l'euchromatine en interphase et les chromosomes en mitose. J'ai aussi démontré la nécessité de la protéine TRIP12 pour l'entrée en mitose et la durée de la phase S par des mécanismes moléculaires qui restent à élucider. TRIP12 joue aussi un rôle primordial dans la progression de la mitose puisqu'une inhibition de son expression prolonge l'activation du point de contrôle du fuseau mitotique, provoque une mauvaise ségrégation des chromosomes et diminue la prolifération cellulaire.

A l'instar des protéines mitotiques, l'expression de TRIP12 débute pendant la phase S, atteint un maximum en phase G₂/M et disparaît en phase G₁. Cette régulation est observée dans plusieurs types cellulaires (travaux de thèse de Manon Brunet). Les mécanismes qui régissent cette régulation ne sont encore que partiellement connus. Toutefois, mes résultats montrent que l'expression de l'ARNm de *Trp12* ne varie pas au cours du cycle cellulaire. Ceci est en accord avec une étude, qui ne retrouve pas l'ARNm de TRIP12 dans la liste des ARNm dont l'expression fluctue au cours du cycle cellulaire dans des cellules HeLaS3²³⁴. L'induction de TRIP12 serait due à une augmentation de la traduction de son ARNm qui débiterait au cours de la phase S. En effet, des approches de protéomique comparative au cours du cycle cellulaire ont récemment identifié que TRIP12 est une protéine nouvellement synthétisée pendant la phase S²³⁵. De plus, TRIP12 disparaît du noyau des cellules en phase G₁, phase au cours de laquelle de nombreuses protéines mitotiques (Cycline B1, cdc20, etc...) sont dégradées par le complexe protéique APC/C-Cdh1. TRIP12 possède dans sa séquence protéique des domaines « Ken box » (aa 1496-1570/ source UniProt) et « Destruction box » (aa 859-867 and aa 1546-1554/ ressource ELM). Ces deux dégrons reconnus par le complexe APC/C provoqueraient la dégradation de TRIP12 par le protéasome pendant la phase G₁. Cependant, d'autres facteurs seraient impliqués dans la régulation de la stabilité de TRIP12. En effet, TRIP12 peut être ubiquitinée (**Figure 32**) et la déubiquitinase USP7 hydrolyse ces ubiquitines pour stabiliser TRIP12^{236,205}. Comme la plupart des protéines, UHRF1 (*Ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1*) est stabilisée par la déubiquitinase USP7. Pendant

la mitose, le complexe Cycline B1/CDK1 initie la dégradation de la protéine UHFR1 en la phosphorylant sur son domaine d'interaction avec USP7. Cette phosphorylation provoque une perte d'interaction entre USP7 et UHFR1 qui expose cette dernière à une dégradation dépendante du protéasome²³⁷. Un mécanisme similaire pourrait exister dans le cas de TRIP12 puisqu'une étude récente a identifié des protéines phosphorylées par CDK1 en mitose¹⁸⁷. Parmi les peptides phosphorylés par CDK1 identifiés figure un peptide de la protéine TRIP12 contenant la serine 424. De manière intéressante, ce résidu est situé dans la séquence minimale d'interaction de TRIP12 avec USP7²⁰⁷. Par conséquent, la variation d'expression de TRIP12 au cours du cycle cellulaire impliquerait une combinaison de différents processus de régulation comprenant la traduction, la stabilisation et la dégradation de la protéine.

Au cours de mes travaux, j'ai également identifié et caractérisé un nouveau domaine fonctionnel IDR (*Intrinsically Disordered Region*) situé dans la partie N-terminale de TRIP12 lui permettant d'interagir avec la chromatine. Ces domaines IDRs ne forment pas de structure 3D stable. Les domaines IDRs sont prédits selon les propriétés physicochimiques des acides aminés composant la séquence protéique²³⁸. En effet, ils sont principalement composés d'acides aminés basiques chargés positivement et hydrophiles, telles que les lysines, arginines, sérines et histidines²³⁹. Ces domaines permettent l'interaction des protéines avec l'ADN, l'ARN ou d'autres protéines. La présence de domaines désordonnés dans la partie N-terminale des protéines est commune aux protéines qui interagissent avec l'ADN²³⁸. Par exemple, les facteurs de transcription Ets-1 (*Erythroblastosis virus E26 homolog-1*) et p53 ainsi que la protéine RPA en sont pourvues. De plus, les IDRs peuvent être la cible de modifications post-traductionnelles qui modifient leur conformation. Ainsi, ces modifications peuvent favoriser l'interaction internucléosomale lors de la condensation des chromosomes en modifiant la queue N-terminale des histones H3 et H4 ou favoriser la transactivation de p53 par CBP (*Cyclic-AMP response element-binding protein (CREB)-binding protein*)^{240,241}. L'interaction des domaines IDR avec l'ADN chargé négativement se fait sans spécificité de séquence nucléotidique. Toutefois, la spécificité de séquence peut être apportée à la protéine par des domaines de liaisons à l'ADN classiques, tels que les domaines à doigts de zinc. Dans ce cas de figure, le domaine IDR confère à la protéine une meilleure interaction avec l'ADN²⁴². Une étude démontre que l'interaction IDR/ADN modifie la structure de la chromatine et joue un rôle dans la régulation de l'expression de gènes²⁴³. Cette étude révèle que des *super-enhancers* (SE), qui sont des clusters d'enhancers rassemblant les facteurs nécessaires pour une transcription efficace, contiennent des protéines co-activatrices de la transcription BRD4 (*Bromodomain-containing protein 4*) et MED1 (*Mediator complex subunit 1*). Ces deux protéines favorisent une forte transcription, *via* leur domaine IDR, en formant des gouttelettes de séparation de phase liquide-liquide qui permettent de concentrer et de compartimentaliser

la machinerie transcriptionnelle. Ce processus est régi par l'oligomérisation et les nombreuses interactions labiles que peuvent former ces protéines au niveau de foyers de transcription. Dans ce phénomène biophysique, un domaine nucléaire et le nucléoplasme environnant forment deux phases séparées, de la même manière que des gouttes d'huile dans de l'eau. La nucléation d'un domaine nucléaire par séparation de phase liquide-liquide requiert des concentrations supra-saturantes des protéines le composant. De plus, la localisation de BRD4 et MED1 par immunofluorescence révèle un marquage ponctiforme dans le noyau et une co-localisation avec l'euchromatine. J'ai obtenu des résultats similaires avec TRIP12, ce qui suggère que TRIP12 pourrait jouer un rôle dans ce mécanisme de contrôle global de l'expression des gènes *via* son domaine IDR.

De manière intéressante, la découverte d'une interaction de TRIP12 avec la chromatine et de la régulation de son expression au cours du cycle cellulaire s'accorde parfaitement avec la littérature. En effet, TRIP12 entraîne la dégradation des protéines qui exercent des fonctions en relation avec la chromatine, notamment les protéines ARF et USP7 lesquelles contrôlent l'expression du facteur de transcription p53^{193,207}. TRIP12 pourrait participer à la régulation de l'activation de la voie de signalisation p53 puisqu'elle entraîne la dégradation par le protéasome d'ARF et d'USP7, deux protéines qui stabilisent p53. La transcription étant ralentie, voire arrêtée au moment de l'entrée en mitose, la présence de TRIP12 sur la chromatine à ce moment pourrait être indispensable à la dégradation des facteurs de transcription Sox6 et PTF1a pour inhiber la transcription des gènes ciblés par ces derniers^{222,181}. De plus, TRIP12 contrôle des protéines qui participent au remodelage de la chromatine telles que BAF57 et ASXL1^{211,215}. Ce processus est hautement actif au moment de la réplication et de la condensation de chromosomes en mitose, étapes du cycle cellulaire pendant lesquelles TRIP12 est exprimée et présente sur la chromatine. La réparation des dommages à l'ADN (DDR) est également un mécanisme moléculaire régulé au cours du cycle cellulaire, actif en interphase, il est inhibé pendant la mitose²⁴⁴. Cette inhibition est en partie liée à l'absence de recrutement de l'E3 ubiquitine ligase RNF168 au niveau des cassures. Cette signalisation est réactivée pendant la phase G₁ pour réparer les dommages à l'ADN qui persistent en fin de phase G₂ ou créés pendant la mitose²⁴⁴. TRIP12 participerait aux mécanismes d'inhibition de la DDR pendant la mitose, en interagissant avec la chromatine *via* son IDR et empêcherait l'accessibilité de la chromatine à RNF168 en provoquant sa dégradation par le protéasome. La disparition de TRIP12, en phase G₁, serait un des premiers mécanismes induisant la réactivation de la DDR et de la voie de signalisation p53 pour permettre la réparation de l'ADN.

Par ailleurs, j'ai également démontré que la perte d'expression de TRIP12 raccourcit la durée de réplication de l'ADN et plus spécifiquement de l'euchromatine. Comme décrit dans

l'introduction, la réplication de l'ADN est un processus très ordonné qui requiert l'assemblage séquentiel de complexes protéiques tels que le complexe de pré-réplication, de pré-initiation et le replisome. TRIP12 participerait à la régulation de la réplication de l'ADN en interagissant ou en contrôlant l'expression des facteurs composant ces complexes. De manière intéressante, TRIP12 a été retrouvée dans l'interactome de RPA, une protéine affine pour l'ADN simple brin²⁴⁵. De plus, il a récemment été démontré que les IDR permettent l'interaction avec l'ADN simple brin et avec les protéines qui interagissent avec cette forme d'ADN^{246,247}. Une fois l'origine de réplication activée, l'hexamère MCM2-7 déroule la double hélice d'ADN en brisant les liaisons hydrogènes entre les bases azotées. Ceci forme de l'ADN simple brin auquel TRIP12 pourrait s'accrocher grâce à son domaine IDR et permettre ainsi le recrutement de RPA. Par ailleurs, j'ai mesuré par une analyse protéomique différentielle (SWATH-MS) une augmentation de l'expression de la kinase dépendante des cyclines CDK6 dans des cellules déplétées de la protéine TRIP12. Il est connu que l'activité kinase de CDK6 est nécessaire pour l'assemblage du complexe de pré-réplication puisqu'elle induit l'expression de *cdc6* et *cdt1*²⁴⁸. Des données supplémentaires obtenues par une analyse transcriptomique sur micro-puces (données non incluses dans le papier) montrent une augmentation de l'expression de l'ARNm de *Cdk6* dans les cellules déplétées de la protéine TRIP12. Il est probable que TRIP12 contrôle le niveau d'expression de CDK6 au niveau de son ARNm. TRIP12 pourrait restructurer la chromatine au niveau du promoteur du gène *Cdk6* via son domaine IDR et inhiber sa transcription. L'absence de TRIP12 en phase G₁ permettrait une plus forte transcription de CDK6 dont l'activité kinase est nécessaire pour la progression en G₁ et lors de la transition G₁/S. De plus, la progression dans les différentes étapes de la réplication dépend fortement de l'organisation de la chromatine²⁴⁹. Les machineries de la transcription et de la réplication créent des boucles de chromatine stables dans lesquelles les facteurs s'agrègent et modifient la structure de la chromatine. Des protéines non histones qui affectent la structure de l'ADN y sont localisées. La protéine Rif1 colocalise avec les foyers de réplication de milieu et de fin de phase S, au niveau de l'hétérochromatine. Cette protéine permet la réplication de ces zones du génome en favorisant la formation des boucles de chromatine en interagissant avec la matrice nucléaire³³. J'ai montré que TRIP12 co-localise avec l'euchromatine en phase S, par l'intermédiaire de son domaine IDR. Elle participerait à la structuration de ces boucles de chromatine puisqu'il est décrit que les protéines possédant des domaines IDRs participent aux processus de séparation de phase liquide-liquide en interagissant de façon labile avec elles-mêmes (oligomérisation) et/ou avec les autres protéines pour former un hydrogel. De plus, de nombreuses protéines impliquées dans la séparation de phase liquide-liquide possèdent, comme TRIP12, des domaines protéiques WW (tryptophane/tryptophane) qui permettent leur oligomérisation et favorisent les interactions protéines/protéines. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que j'observe qu'une

surexpression de l'IDR de TRIP12 modifie la structure de la chromatine. De plus, TRIP12 régule le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF qui co-localise avec la machinerie de réplication pour faciliter la progression de la fourche de réplication²⁵⁰. Il est donc envisageable que TRIP12 contrôle la progression en phase S et la durée de la réplication en modifiant la structure de la chromatine par différents mécanismes.

Mes observations montrent que TRIP12 exerce une fonction dans l'entrée et la progression en mitose indépendamment de son activité catalytique. Cependant, ces expériences réalisées par surexpression d'un mutant catalytique de TRIP12 doivent être interprétées avec précaution. En effet, j'ai montré que la surexpression de différents domaines de TRIP12 (excepté le domaine N-terminal) provoque une inhibition de la division cellulaire. Il est probable que la surexpression des constructions TRIP12-GFP pendant toutes les étapes du cycle cellulaire soit délétère puisque j'ai montré que la protéine TRIP12 endogène est finement régulée au cours du cycle cellulaire. J'ai voulu identifier les partenaires et les substrats de TRIP12 par des approches de spectrométrie de masse dans le but de préciser les mécanismes moléculaires des différentes fonctions de TRIP12. J'ai privilégié l'immunoprécipitation de la protéine TRIP12 endogène à celle d'une protéine TRIP12 exogène étiquetée en raison de la létalité cellulaire induite par la surexpression de TRIP12. Malheureusement, ces expériences n'ont pas été couronnées de succès. A posteriori, il est probable que la quantité de TRIP12 immunoprécipitée ait été insuffisante ou les conditions d'immunoprécipitation trop stringentes pour identifier des partenaires. Pour de multiples raisons, l'identification des interactants et surtout des substrats des E3 ubiquitine ligases reste encore difficile²⁵¹. Récemment développée, l'approche BioID (*Biotin Identification*) pourrait apporter plus de résultats²⁵².

Mes travaux ont montré qu'une déplétion de TRIP12 entraîne une activation prolongée du point de contrôle du fuseau mitotique (SAC). Au début de la mitose, la formation du fuseau mitotique et la capture des kinétochores par les microtubules sont simultanées et par conséquent engendrent des erreurs d'attachement des chromosomes au fuseau²⁵³. Tant que ces erreurs ne sont pas corrigées, le SAC reste actif et inhibe la progression en mitose. La correction de ces erreurs est un processus d'attachement et de libération des microtubules des kinétochores très dynamique qui dépend de l'activité de la kinase Aurora B^{66,254}. Pour provoquer le détachement, la kinase Aurora B phosphoryle plusieurs résidus de la protéine HEC1 (*Highly Expressed in Cancer Protein 1*) appartenant au complexe NDC80²⁵⁵. L'hyperphosphorylation d'HEC1 en début de mitose diminue l'affinité du complexe NDC80 avec le microtubule et est corrélée au détachement du microtubule^{256,257}. Cependant les mécanismes moléculaires de détachement restent encore flous. Le mécanisme de recyclage des complexes NDC80 phosphorylés sur HEC1 n'est pas connu et pourrait faire intervenir une

dégradation d'HEC1 et du complexe NDC80 par le protéasome. Afin de tester l'hypothèse d'une intervention de TRIP12 dans ce processus, j'ai recherché la présence de TRIP12 au niveau des kinétochores au cours de la mitose. J'ai montré par immunofluorescence que TRIP12 colocalise avec CREST un marqueur des kinétochores (**Figure 33**).

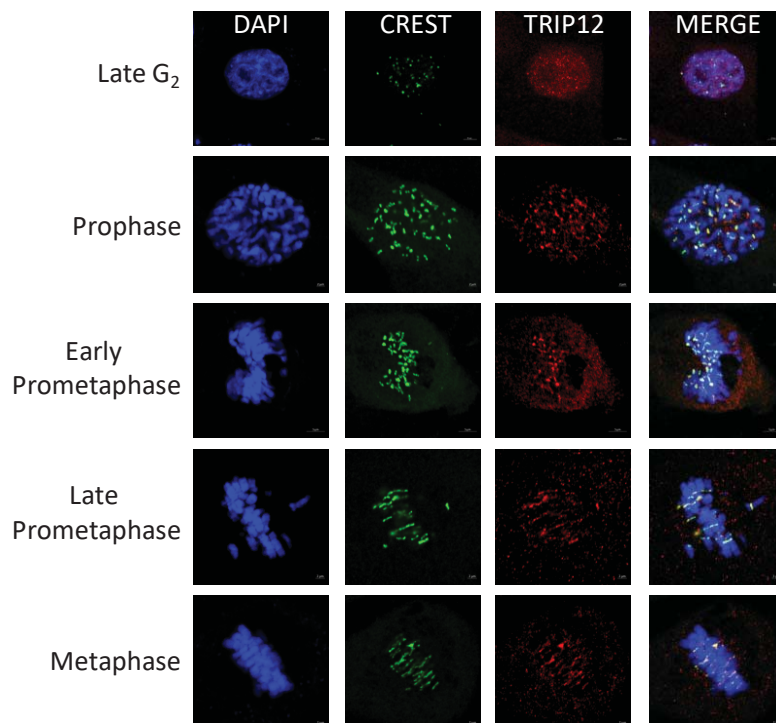


Figure 33 : Localisation de TRIP12 au niveau des kinétochores en mitose.

Le marquage en bleu correspond au DAPI marqueur de l'ADN, le marquage en vert correspond au CREST marqueur des kinétochores et le marquage en rouge correspond à TRIP12.

Pour déterminer si la correction des erreurs d'attachement est affectée en absence de TRIP12, j'ai réalisé une expérience de « monastrol washout » (**Figure 34**). Le monastrol inhibe Eg5, une protéine essentielle pour la séparation des centrosomes en mitose, provoquant une accumulation de cellules ayant des fuseaux mitotiques monopolaires en conformation syntélique (**Figure 13**)^{258,259}. Après élimination du monastrol, les fuseaux monopolaires sont rapidement convertis en fuseaux bipolaires et les attachements syntéliques sont remplacés par des attachements amphitéliques corrects (**Figure 13**)²⁵⁹. Les cellules incapables de libérer un microtubule du kinétochore corrigent moins efficacement les erreurs d'attachements syntéliques retardant ainsi la conversion des fuseaux monopolaires en fuseaux bipolaires. J'ai mis en évidence un retard dans la formation de fuseaux bipolaires après l'élimination du monastrol en absence de TRIP12 (**Figure 34**). Après 20 minutes, 87% des cellules contrôles forment un fuseau bipolaire contre environ 65% pour les trois lignées cellulaires déplétées de la protéine TRIP12. De plus, les cellules déplétées de TRIP12 convertissent préférentiellement leurs fuseaux monopolaires en fuseaux multipolaires contrairement aux cellules contrôles qui les convertissent en fuseaux bipolaires.

L'ensemble de ces résultats démontre une localisation de TRIP12 au niveau des kinétochores et suggère que son absence en mitose retarde la correction des erreurs d'attachements. TRIP12 pourrait donc être l'E3 ubiquitine ligase responsable du recyclage des complexes NDC80 lors de mauvais attachements. Ainsi, l'activation prolongée du SAC observée dans les cellules dépourvues de TRIP12 serait due à un retard dans la correction des erreurs d'attachements qui se produisent en début de mitose.

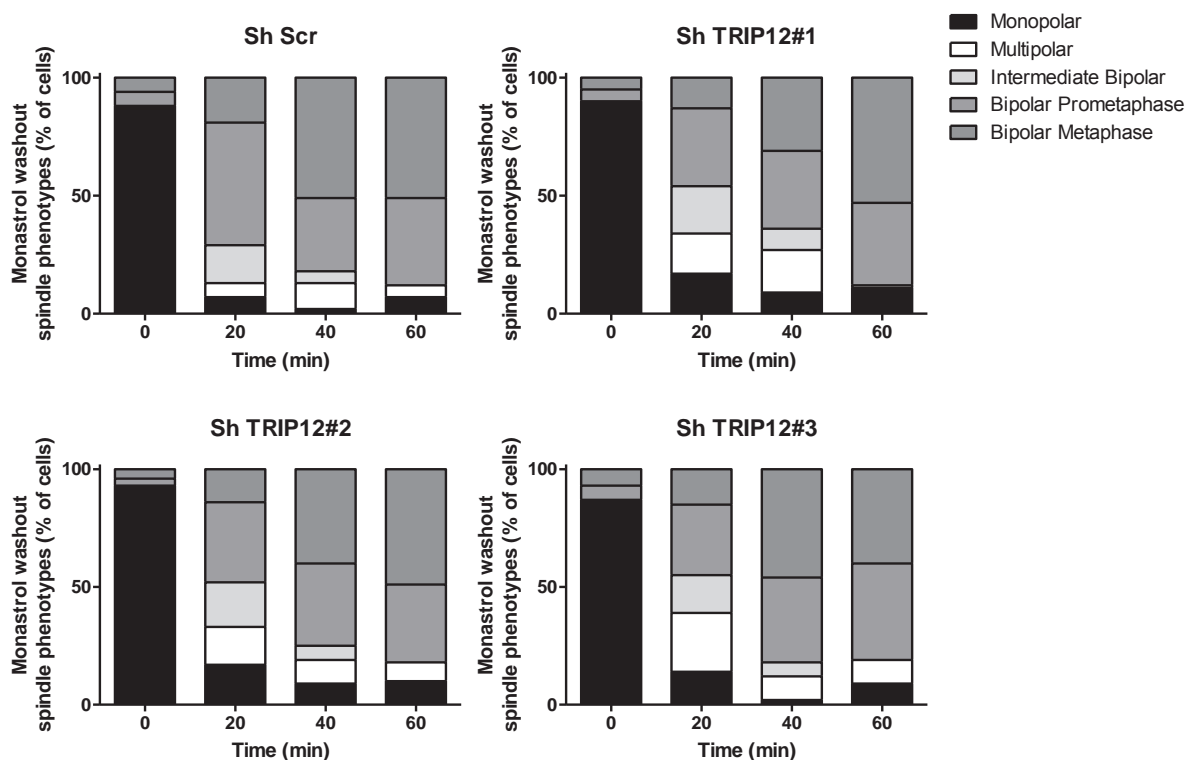


Figure 34: Quantification de l'expérience de « monastrol washout ».

Les cellules contrôles (Sh Scr) ou déplétées en TRIP12 (Sh TRIP12#1, #2 et #3) ont été synchronisées en phase S par un double blocage avec 2 mM de thymidine, puis relâchées dans le cycle cellulaire avec du milieu frais pendant 9h avant un traitement avec 150 mM de monastrol pendant 2h. Les cellules sont ensuite relâchées dans du milieu frais avec 10 µM de MG132 pendant 1h. Toutes les 20 min, les cellules sont fixées pour réaliser une immunofluorescence. Les principaux phénotypes de fuseau mitotique apparus aux différents temps sont quantifiés.

L'équipe dans laquelle j'effectue ma thèse a pour thématique de recherche le cancer du pancréas (CP). Il n'existe pas de chimiothérapie efficace pour ce cancer qui est la 4^{ème} cause de décès par cancer. Le pronostic vital du cancer du pancréas est désastreux avec une survie à cinq ans inférieure à 9%²⁶⁰. Ce pronostic sombre résulte de l'absence de signes cliniques spécifiques et de marqueurs de diagnostic précoce. La chirurgie reste la seule thérapie curative. Cependant dans 85% des cas, les patients sont non opérables en raison du caractère localement avancé ou métastatique de la tumeur. Deux types de chimiothérapies sont utilisés, la gemcitabine est le traitement de référence à visée palliative, le FOLFIRINOX (5-fluorouracile, irinotecan, oxaliplatine) est réservé aux patients en bon état général. Malgré

une forte proportion de tumeurs résistantes, des travaux récents montrent qu'une minorité de tumeurs sont sensibles à ces chimiothérapies classiques²⁶¹. Il est donc nécessaire d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse à ces traitements et de comprendre les bases moléculaires de ce cancer afin de pouvoir le détecter au cours des premiers stades.

Mon équipe d'accueil a publié que l'E3 ubiquitine ligase TRIP12 régule la protéine PTF1a *via* une polyubiquitination et un adressage au protéasome¹⁸¹. PTF1a est un facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes spécifiques des acini pancréatiques, tels que les gènes de l'amylase et de la chymotrypsine. PTF1a est essentiel au développement et à l'homéostasie du pancréas en maintenant le phénotype acinaire¹⁹⁰. L'expression de PTF1a est perdue au cours de la transdifférenciation des cellules acinaires en cellules canalaire, une des premières étapes de la carcinogénèse pancréatique²⁶². Mon équipe a également montré une surexpression de la protéine TRIP12 dans le cancer du pancréas et les lésions préneoplasiques. Cette surexpression s'avère très hétérogène entre les patients et dans les lignées cellulaires dérivées de patients atteints de CP. La surexpression de TRIP12 pourrait être à l'origine de la perte d'expression de PTF1a dès les stades d'initiation de la carcinogénèse pancréatique.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont fourni les bases nécessaires pour meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'hétérogénéité de l'expression de TRIP12 dans les cas de cancer du pancréas. J'ai démontré que l'expression de TRIP12 est finement régulée au cours du cycle cellulaire, absente en phase G₁, son expression est induite en phase S pour atteindre un pic d'expression en G₂ et en mitose. La dérégulation de l'expression de TRIP12 au cours du cycle cellulaire contribue à l'hétérogénéité d'expression de TRIP12 observée dans les lignées cellulaires dérivées de CP. En effet, les résultats de l'équipe démontrent que TRIP12 est toujours exprimée en phase G₁ dans les lignées qui surexpriment TRIP12 (travaux de thèse de Manon Brunet). Ce profil d'expression est lié à une inhibition de sa dégradation impliquant la déubiquitinase USP7 au cours de la phase G₁ (travaux de thèse de Manon Brunet).

Une des fonctions connues de TRIP12 est d'inhiber indirectement la voie de réparation des dommages à l'ADN et d'empêcher la réparation correcte des dommages de l'ADN par NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*)²⁰³. La réparation par NHEJ a lieu majoritairement pendant la phase G₁ pour réparer les cassures d'ADN non réparées en fin de phase G₂ et apparues au moment de la division cellulaire. TRIP12 est toujours exprimée en phase G₁ dans certaines cellules cancéreuses pancréatiques, il est concevable que la surexpression de TRIP12 puisse conférer un avantage lors de la carcinogénèse en créant de l'instabilité génique. En effet, des cassures double brin non réparées empêchent une réplication correcte

de l'ADN et créent de l'aneuploïdie. De plus, d'autres données de l'équipe démontrent que les cellules cancéreuses pancréatiques qui conservent TRIP12 en phase G₁ répondent mieux aux agents anticancéreux classiques induisant des dommages à l'ADN et seraient plus sensibles à la chimiothérapie (travaux de thèse de Manon Brunet).

Par ailleurs, au cours de la cancérisation des cellules la réorganisation du génome des cellules est associée à une profonde modification de leur transcriptome avec pour conséquence un changement de phénotype. Pour rappel, les protéines qui possèdent des domaines IDRs jouent un rôle dans l'interaction des protéines avec les acides nucléiques, la structuration 3D de la chromatine et l'expression des gènes^{238,263,264}. Les données de la littérature montrent que TRIP12 est associée à des complexes de remodelage de chromatine tels que SWI/SNF et PRC, ainsi qu'à de nombreuses protéines associées à la chromatine^{211,215,265}. J'ai également montré qu'une surexpression de TRIP12 altère la structure de la chromatine et des données non publiées de l'équipe révèlent que la déplétion de TRIP12 dans des cellules cancéreuses pancréatiques a pour conséquence une profonde modification de l'expression des gènes. L'ensemble de ces éléments est en faveur d'un rôle de TRIP12 direct (indépendamment de son action sur PTF1a) sur l'organisation de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes au cours de la carcinogenèse pancréatique. En effet, l'altération de l'expression de TRIP12 observée dès l'initiation du cancer du pancréas conduirait à une modification du transcriptome et ainsi participerait à la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses.

Pendant ma thèse j'ai identifié une nouvelle protéine régulée au cours du cycle cellulaire. J'ai découvert de nouvelles fonctions de TRIP12 dans la régulation du cycle cellulaire et de la mitose. J'ai également démontré pour la première fois que TRIP12 interagit avec la chromatine. L'expression de TRIP12 est finement régulée au cours du cycle cellulaire. Une modification du profil d'expression de TRIP12 au cours du cycle cellulaire pourrait avoir des conséquences dramatiques et participer au développement du cancer du pancréas. Les projets de recherche de l'équipe qui feront suite à ma thèse apporteront une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires, dépendant de TRIP12, à l'origine de l'initiation du cancer du pancréas.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153–166 (2009).
2. Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 630–641 (2005).
3. Lim, S. & Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 3079–3093 (2013).
4. Malumbres, M. & Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 222–231 (2001).
5. Hochegger, H., Takeda, S. & Hunt, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 910–916 (2008).
6. Woo, R. A. & Poon, R. Y. C. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **2**, 316–324 (2003).
7. Fung, T. K., Ma, H. T. & Poon, R. Y. C. Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1861–1873 (2007).
8. Viallard, J. F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J. L. & Reiffers, J. [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* **5**, 109–129 (2001).
9. Zerfass-Thome, K. *et al.* p27KIP1 blocks cyclin E-dependent transactivation of cyclin A gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 407–415 (1997).
10. Pines, J. & Hunter, T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**, 760–763 (1990).
11. den Elzen, N. & Pines, J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J. Cell Biol.* **153**, 121–136 (2001).
12. Bockstaele, L., Bisteau, X., Paternot, S. & Roger, P. P. Differential regulation of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK6, evidence that CDK4 might not be activated by CDK7, and design of a CDK6 activating mutation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4188–4200 (2009).

13. Ganuza, M. *et al.* Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion. *EMBO J.* **31**, 2498–2510 (2012).
14. Kaldis, P. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **55**, 284–296 (1999).
15. Pavletich, N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**, 821–828 (1999).
16. Kristjánsdóttir, K. & Rudolph, J. Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem. Biol.* **11**, 1043–1051 (2004).
17. Chow, J. P. H., Poon, R. Y. C. & Ma, H. T. Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1478–1491 (2011).
18. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501–1512 (1999).
19. Lundberg, A. S. & Weinberg, R. A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 753–761 (1998).
20. Cheng, M. *et al.* The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK ‘inhibitors’ are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* **18**, 1571–1583 (1999).
21. Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P. & Méchali, M. DNA replication origin activation in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 360–374 (2015).
22. Remus, D. *et al.* Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* **139**, 719–730 (2009).
23. Heller, R. C. *et al.* Eukaryotic origin-dependent DNA replication in vitro reveals sequential action of DDK and S-CDK kinases. *Cell* **146**, 80–91 (2011).
24. Tanaka, S. *et al.* CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**, 328–332 (2007).

25. Im, J.-S. *et al.* Assembly of the Cdc45-Mcm2-7-GINS complex in human cells requires the Ctf4/And-1, RecQL4, and Mcm10 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15628–15632 (2009).
26. Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Dunphy, W. G. Direct regulation of Treslin by cyclin-dependent kinase is essential for the onset of DNA replication. *J. Cell Biol.* **193**, 995–1007 (2011).
27. Hwang, H. C. & Clurman, B. E. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* **24**, 2776–2786 (2005).
28. Nigg, E. A. Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol.* **17**, 215–221 (2007).
29. Bashir, T., Hörlein, R., Rommelaere, J. & Willwand, K. Cyclin A activates the DNA polymerase δ -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5522–5527 (2000).
30. Rhind, N. & Gilbert, D. M. DNA Replication Timing. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
31. Dellino, G. I. *et al.* Genome-wide mapping of human DNA-replication origins: levels of transcription at ORC1 sites regulate origin selection and replication timing. *Genome Res.* **23**, 1–11 (2013).
32. Hansen, R. S. *et al.* Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 139–144 (2010).
33. Yamazaki, S. *et al.* Rif1 regulates the replication timing domains on the human genome. *EMBO J.* **31**, 3667–3677 (2012).
34. Coverley, D., Laman, H. & Laskey, R. A. Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat. Cell Biol.* **4**, 523–528 (2002).
35. Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A. A. & Oegema, K. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **155**, 1109–1116 (2001).
36. Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V. & Medema, R. H. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J. Cell Biol.* **185**, 193–202 (2009).

37. Lukas, C. *et al.* Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* **401**, 815–818 (1999).
38. O’Farrell, P. H. Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol.* **11**, 512–519 (2001).
39. Li, C., Andrade, M., Dunbrack, R. & Enders, G. H. A bifunctional regulatory element in human somatic Wee1 mediates cyclin A/Cdk2 binding and Crm1-dependent nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 116–130 (2010).
40. Vigneron, S. *et al.* Cyclin A-cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry. *Dev. Cell* **45**, 637-650.e7 (2018).
41. Yanagida, M. The role of model organisms in the history of mitosis research. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a015768 (2014).
42. Antonin, W. & Neumann, H. Chromosome condensation and decondensation during mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **40**, 15–22 (2016).
43. Hirano, T. & Mitchison, T. J. A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* **79**, 449–458 (1994).
44. Thadani, R., Uhlmann, F. & Heeger, S. Condensin, chromatin crossbarring and chromosome condensation. *Curr. Biol. CB* **22**, R1012-1021 (2012).
45. Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R. & Ellenberg, J. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell* **108**, 83–96 (2002).
46. Yang, L., Guan, T. & Gerace, L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J. Cell Biol.* **137**, 1199–1210 (1997).
47. Sivan, G., Kedersha, N. & Elroy-Stein, O. Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6639–6646 (2007).
48. Ma, H. T. & Poon, R. Y. C. How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *Biochem. J.* **435**, 17–31 (2011).

49. Gadea, B. B. & Ruderman, J. V. Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4493–4498 (2006).
50. Chou, Y. H., Bischoff, J. R., Beach, D. & Goldman, R. D. Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin. *Cell* **62**, 1063–1071 (1990).
51. Zieve, G. W., Heidemann, S. R. & McIntosh, J. R. Isolation and partial characterization of a cage of filaments that surrounds the mammalian mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **87**, 160–169 (1980).
52. Fink, J. *et al.* External forces control mitotic spindle positioning. *Nat. Cell Biol.* **13**, 771–778 (2011).
53. Barr, F. A. Golgi inheritance: shaken but not stirred. *J. Cell Biol.* **164**, 955–958 (2004).
54. Shima, D. T., Haldar, K., Pepperkok, R., Watson, R. & Warren, G. Partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in living HeLa cells. *J. Cell Biol.* **137**, 1211–1228 (1997).
55. West, M., Zurek, N., Hoenger, A. & Voeltz, G. K. A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J. Cell Biol.* **193**, 333–346 (2011).
56. Schatten, H. The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 667–686 (2008).
57. Rieder, C. L. & Maiato, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* **7**, 637–651 (2004).
58. Cheeseman, I. M. The kinetochore. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a015826 (2014).
59. Khodjakov, A., Copenagle, L., Gordon, M. B., Compton, D. A. & Kapoor, T. M. Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis. *J. Cell Biol.* **160**, 671–683 (2003).
60. Holy, T. E., Dogterom, M., Yurke, B. & Leibler, S. Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6228–6231 (1997).
61. Maiato, H., Rieder, C. L. & Khodjakov, A. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J. Cell Biol.* **167**, 831–840 (2004).

62. McIntosh, J. R., Grishchuk, E. L. & West, R. R. Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 193–219 (2002).
63. Salmon, E. D., Cimini, D., Cameron, L. A. & DeLuca, J. G. Merotelic kinetochores in mammalian tissue cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **360**, 553–568 (2005).
64. Cimini, D., Moree, B., Canman, J. C. & Salmon, E. D. Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J. Cell Sci.* **116**, 4213–4225 (2003).
65. Cimini, D., Cameron, L. A. & Salmon, E. D. Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes. *Curr. Biol. CB* **14**, 2149–2155 (2004).
66. Cimini, D., Wan, X., Hirel, C. B. & Salmon, E. D. Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr. Biol. CB* **16**, 1711–1718 (2006).
67. Joglekar, A. P. & Aravamudhan, P. How the kinetochore switches off the spindle assembly checkpoint. *Cell Cycle Georget. Tex* **15**, 7–8 (2016).
68. Musacchio, A. & Hardwick, K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 731–741 (2002).
69. Malmanche, N., Maia, A. & Sunkel, C. E. The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett.* **580**, 2888–2895 (2006).
70. Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A. & Sluder, G. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* **130**, 941–948 (1995).
71. Hoyt, M. A., Totis, L. & Roberts, B. T. S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**, 507–517 (1991).
72. Li, R. & Murray, A. W. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**, 519–531 (1991).
73. Sudakin, V., Chan, G. K. & Yen, T. J. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* **154**, 925–936 (2001).

74. De Antoni, A. *et al.* The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol. CB* **15**, 214–225 (2005).
75. Chao, W. C. H., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E. H. & Barford, D. Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* **484**, 208–213 (2012).
76. Izawa, D. & Pines, J. Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J. Cell Biol.* **199**, 27–37 (2012).
77. Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G. & Taylor, S. S. The spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol. CB* **22**, R966–980 (2012).
78. King, R. W., Glotzer, M. & Kirschner, M. W. Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1343–1357 (1996).
79. Pfleger, C. M. & Kirschner, M. W. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* **14**, 655–665 (2000).
80. Waizenegger, I., Giménez-Abián, J. F., Wernic, D. & Peters, J.-M. Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr. Biol. CB* **12**, 1368–1378 (2002).
81. Clute, P. & Pines, J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat. Cell Biol.* **1**, 82–87 (1999).
82. Mitchison, T., Evans, L., Schulze, E. & Kirschner, M. Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell* **45**, 515–527 (1986).
83. Rogers, G. C. *et al.* Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature* **427**, 364–370 (2004).
84. Brust-Mascher, I. & Scholey, J. M. Mitotic motors and chromosome segregation: the mechanism of anaphase B. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1149–1153 (2011).
85. Kiyomitsu, T. & Cheeseman, I. M. Cortical dynein and asymmetric membrane elongation coordinately position the spindle in anaphase. *Cell* **154**, 391–402 (2013).

86. Buttrick, G. J. *et al.* Nsk1 ensures accurate chromosome segregation by promoting association of kinetochores to spindle poles during anaphase B. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4486–4502 (2011).
87. Potapova, T. A. *et al.* The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature* **440**, 954–958 (2006).
88. Steen, R. L., Martins, S. B., Taskén, K. & Collas, P. Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J. Cell Biol.* **150**, 1251–1262 (2000).
89. Güttinger, S., Laurell, E. & Kutay, U. Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 178–191 (2009).
90. Douglas, M. E., Davies, T., Joseph, N. & Mishima, M. Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Curr. Biol. CB* **20**, 927–933 (2010).
91. Schvartzman, J.-M., Sotillo, R. & Benezra, R. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 102–115 (2010).
92. Sotillo, R. *et al.* Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* **11**, 9–23 (2007).
93. Carvalhal, S., Tavares, A., Santos, M. B., Mirkovic, M. & Oliveira, R. A. A quantitative analysis of cohesin decay in mitotic fidelity. *J. Cell Biol.* **217**, 3343–3353 (2018).
94. Saunders, W. Centrosomal amplification and spindle multipolarity in cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 25–32 (2005).
95. Gisselsson, D. *et al.* When the genome plays dice: circumvention of the spindle assembly checkpoint and near-random chromosome segregation in multipolar cancer cell mitoses. *PloS One* **3**, e1871 (2008).
96. Lentini, L., Amato, A., Schillaci, T. & Di Leonardo, A. Simultaneous Aurora-A/STK15 overexpression and centrosome amplification induce chromosomal instability in tumour cells with a MIN phenotype. *BMC Cancer* **7**, 212 (2007).

97. Ganem, N. J., Godinho, S. A. & Pellman, D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* **460**, 278–282 (2009).
98. Hoffelder, D. R. *et al.* Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* **112**, 389–397 (2004).
99. McClintock, B. The Production of Homozygous Deficient Tissues with Mutant Characteristics by Means of the Aberrant Mitotic Behavior of Ring-Shaped Chromosomes. *Genetics* **23**, 315–376 (1938).
100. Shuster, M. I. *et al.* A consistent pattern of RIN1 rearrangements in oral squamous cell carcinoma cell lines supports a breakage-fusion-bridge cycle model for 11q13 amplification. *Genes. Chromosomes Cancer* **28**, 153–163 (2000).
101. Jin, C. *et al.* Molecular cytogenetic characterization of the 11q13 amplicon in head and neck squamous cell carcinoma. *Cytogenet. Genome Res.* **115**, 99–106 (2006).
102. Gisselsson, D. *et al.* Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12683–12688 (2001).
103. Bakhoum, S. F., Kabeche, L., Murnane, J. P., Zaki, B. I. & Compton, D. A. DNA-damage response during mitosis induces whole-chromosome missegregation. *Cancer Discov.* **4**, 1281–1289 (2014).
104. Levine, M. S. & Holland, A. J. The impact of mitotic errors on cell proliferation and tumorigenesis. *Genes Dev.* **32**, 620–638 (2018).
105. Daum, J. R. *et al.* Cohesion fatigue induces chromatid separation in cells delayed at metaphase. *Curr. Biol. CB* **21**, 1018–1024 (2011).
106. Bajer, A. S. & Vantard, M. Microtubule dynamics determine chromosome lagging and transport of acentric fragments. *Mutat. Res.* **201**, 271–281 (1988).

107. Thompson, S. L. & Compton, D. A. Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17974–17978 (2011).
108. Brito, D. A. & Rieder, C. L. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol. CB* **16**, 1194–1200 (2006).
109. Rossio, V., Galati, E. & Piatti, S. Adapt or die: how eukaryotic cells respond to prolonged activation of the spindle assembly checkpoint. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 1645–1649 (2010).
110. Gisselsson, D. *et al.* Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am. J. Pathol.* **158**, 199–206 (2001).
111. Gisselsson, D. Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma* **117**, 511–519 (2008).
112. Shimizu, N., Shingaki, K., Kaneko-Sasaguri, Y., Hashizume, T. & Kanda, T. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp. Cell Res.* **302**, 233–243 (2005).
113. Shimizu, N., Misaka, N. & Utani, K. Nonselective DNA damage induced by a replication inhibitor results in the selective elimination of extrachromosomal double minutes from human cancer cells. *Genes. Chromosomes Cancer* **46**, 865–874 (2007).
114. Toledo, F., Le Roscouet, D., Buttin, G. & Debatisse, M. Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *EMBO J.* **11**, 2665–2673 (1992).
115. Erhardt, K., Silfverswärd, C. & Auer, G. Nuclear DNA content and nuclear atypia. Relation to survival in patients with breast adenocarcinoma and serious ovarian tumors. *Anticancer Res.* **9**, 1325–1330 (1989).
116. Takeshima, N., Hirai, Y. & Hasumi, K. Prognostic validity of neoplastic cells with notable nuclear atypia in endometrial cancer. *Obstet. Gynecol.* **92**, 119–123 (1998).

117. Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Lengauer, C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* **9**, M57-60 (1999).
118. Duesberg, P. *et al.* How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res.* **19**, 4887–4906 (1999).
119. Jallepalli, P. V. & Lengauer, C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 109–117 (2001).
120. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**, 761, 763 (1997).
121. Nowak, M. A. *et al.* The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16226–16231 (2002).
122. Nowell, P. C. Genetic instability and tumor development. *Basic Life Sci.* **57**, 221–228; discussion 228-231 (1991).
123. Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L. & Hershko, A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1365–1368 (1980).
124. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479 (1998).
125. Ciechanover, A., Hod, Y. & Hershko, A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 1100–1105 (1978).
126. Rotin, D. & Kumar, S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 398–409 (2009).
127. Varshavsky, A. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **20**, 1298–1345 (2011).
128. Haglund, K. *et al.* Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 461–466 (2003).

129. Han, Y. G., Yun, M., Choi, M., Lee, S.-G. & Kim, H. TRAP regulates Histone H2B monoubiquitination in DNA damage response pathways. *Oncol. Rep.* **41**, 3305–3312 (2019).
130. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135–141 (2002).
131. Dikic, I., Wakatsuki, S. & Walters, K. J. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 659–671 (2009).
132. Clague, M. J. *et al.* Deubiquitylases from genes to organism. *Physiol. Rev.* **93**, 1289–1315 (2013).
133. Nijman, S. M. B. *et al.* A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**, 773–786 (2005).
134. Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**, 94–102 (2000).
135. Xu, P. *et al.* Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133–145 (2009).
136. Matsumoto, M. L. *et al.* K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol. Cell* **39**, 477–484 (2010).
137. Grice, G. L. *et al.* The Proteasome Distinguishes between Heterotypic and Homotypic Lysine-11-Linked Polyubiquitin Chains. *Cell Rep.* **12**, 545–553 (2015).
138. Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S. & Sorkin, A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol. Cell* **21**, 737–748 (2006).
139. Panier, S. & Durocher, D. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair* **8**, 436–443 (2009).
140. Morris, J. R. & Solomon, E. BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 807–817 (2004).

141. Ordureau, A. *et al.* Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol. Cell* **56**, 360–375 (2014).
142. Gatti, M. *et al.* RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage. *Cell Rep.* **10**, 226–238 (2015).
143. Wang, Q. *et al.* The E3 ubiquitin ligase AMFR and INSIG1 bridge the activation of TBK1 kinase by modifying the adaptor STING. *Immunity* **41**, 919–933 (2014).
144. Fei, C. *et al.* Smurf1-Mediated Lys29-Linked Nonproteolytic Polyubiquitination of Axin Negatively Regulates Wnt/ β -Catenin Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4095–4105 (2013).
145. Huang, H. *et al.* K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity* **33**, 60–70 (2010).
146. Al-Hakim, A. K. *et al.* Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem. J.* **411**, 249–260 (2008).
147. Yuan, W.-C. *et al.* K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking. *Mol. Cell* **54**, 586–600 (2014).
148. Akutsu, M., Dikic, I. & Bremm, A. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 875–880 (2016).
149. Kim, H. C. & Huibregtse, J. M. Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3307–3318 (2009).
150. Kobayashi, F., Nishiuchi, T., Takaki, K. & Konno, H. Ubiquitin chain specificities of E6AP E3 ligase and its HECT domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **496**, 686–692 (2018).
151. Li, W. *et al.* Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3**, e1487 (2008).
152. Buetow, L. *et al.* Activation of a primed RING E3-E2-ubiquitin complex by non-covalent ubiquitin. *Mol. Cell* **58**, 297–310 (2015).

153. Yin, Q. *et al.* E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 658–666 (2009).
154. Chang, L. & Barford, D. Insights into the anaphase-promoting complex: a molecular machine that regulates mitosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **29**, 1–9 (2014).
155. Ohi, M. D., Vander Kooi, C. W., Rosenberg, J. A., Chazin, W. J. & Gould, K. L. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 250–255 (2003).
156. Tu, D., Li, W., Ye, Y. & Brunger, A. T. Structure and function of the yeast U-box-containing ubiquitin ligase Ufd2p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15599–15606 (2007).
157. Vander Kooi, C. W. *et al.* The Prp19 U-box crystal structure suggests a common dimeric architecture for a class of oligomeric E3 ubiquitin ligases. *Biochemistry* **45**, 121–130 (2006).
158. Huang, L. *et al.* Structure of an E6AP-Ubch7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* **286**, 1321–1326 (1999).
159. Staub, O. *et al.* WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* **15**, 2371–2380 (1996).
160. Garcia-Gonzalo, F. R. & Rosa, J. L. The HERC proteins: functional and evolutionary insights. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **62**, 1826–1838 (2005).
161. Spratt, D. E., Walden, H. & Shaw, G. S. RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem. J.* **458**, 421–437 (2014).
162. Zhang, Y. *et al.* Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13354–13359 (2000).
163. Wenzel, D. M., Lissounov, A., Brzovic, P. S. & Klevit, R. E. UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature* **474**, 105–108 (2011).
164. Senft, D., Qi, J. & Ronai, Z. A. Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 69–88 (2018).

165. Qi, J. & Ronai, Z. A. Dysregulation of ubiquitin ligases in cancer. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **23**, 1–11 (2015).
166. Gossage, L., Eisen, T. & Maher, E. R. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 55–64 (2015).
167. Savage, K. I. & Harkin, D. P. BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS J.* **282**, 630–646 (2015).
168. Khurana, A. *et al.* Regulation of the ring finger E3 ligase Siah2 by p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* **281**, 35316–35326 (2006).
169. Wang, X., Wang, J. & Jiang, X. MdmX protein is essential for Mdm2 protein-mediated p53 polyubiquitination. *J. Biol. Chem.* **286**, 23725–23734 (2011).
170. Singh, N. & Singh, A. B. Deubiquitinases and cancer: A snapshot. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **103**, 22–26 (2016).
171. Sacco, J. J., Coulson, J. M., Clague, M. J. & Urbé, S. Emerging roles of deubiquitinases in cancer-associated pathways. *IUBMB Life* **62**, 140–157 (2010).
172. Zou, Q. *et al.* USP15 stabilizes MDM2 to mediate cancer-cell survival and inhibit antitumor T cell responses. *Nat. Immunol.* **15**, 562–570 (2014).
173. Welcker, M. *et al.* The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9085–9090 (2004).
174. Yeh, C.-H., Bellon, M. & Nicot, C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Mol. Cancer* **17**, 115 (2018).
175. Adams, J. & Kauffman, M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest.* **22**, 304–311 (2004).
176. Suzuki, E. *et al.* Molecular mechanisms of bortezomib resistant adenocarcinoma cells. *PLoS One* **6**, e27996 (2011).

177. Morrow, J. K., Lin, H.-K., Sun, S.-C. & Zhang, S. Targeting ubiquitination for cancer therapies. *Future Med. Chem.* **7**, 2333–2350 (2015).
178. Lee, J. W., Choi, H. S., Gyuris, J., Brent, R. & Moore, D. D. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **9**, 243–254 (1995).
179. Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 775–784 (1993).
180. Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495–505 (1993).
181. Hanoun, N. *et al.* The E3 ubiquitin ligase thyroid hormone receptor-interacting protein 12 targets pancreas transcription factor 1a for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* **289**, 35593–35604 (2014).
182. Aravind, L. The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 273–275 (2001).
183. Ju, D., Wang, X., Xu, H. & Xie, Y. The armadillo repeats of the Ufd4 ubiquitin ligase recognize ubiquitin-fusion proteins. *FEBS Lett.* **581**, 265–270 (2007).
184. Park, Y., Yoon, S. K. & Yoon, J.-B. TRIP12 functions as an E3 ubiquitin ligase of APP-BP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 294–298 (2008).
185. Park, Y., Yoon, S. K. & Yoon, J.-B. The HECT domain of TRIP12 ubiquitinates substrates of the ubiquitin fusion degradation pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 1540–1549 (2009).
186. Henderson, J. M. *et al.* Identification of HECT E3 ubiquitin ligase family genes involved in stem cell regulation and regeneration in planarians. *Dev. Biol.* (2015). doi:10.1016/j.ydbio.2015.04.021

187. Petrone, A., Adamo, M. E., Cheng, C. & Kettenbach, A. N. Identification of Candidate Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **15**, 2448–2461 (2016).
188. Blasius, M. *et al.* A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome Biol.* **12**, R78 (2011).
189. Matsuoka, S. *et al.* ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**, 1160–1166 (2007).
190. Krah, N. M. *et al.* The acinar differentiation determinant PTF1A inhibits initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *eLife* **4**, (2015).
191. Junttila, M. R. & Evan, G. I. p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 821–829 (2009).
192. Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. & Pandolfi, P. P. Nucleophosmin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 493–505 (2006).
193. Chen, D., Shan, J., Zhu, W.-G., Qin, J. & Gu, W. Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature* **464**, 624–627 (2010).
194. Lo, D. *et al.* Nucleostemin stabilizes ARF by inhibiting the ubiquitin ligase ULF. *Oncogene* **34**, 1688–1697 (2015).
195. Chio, I. I. C. *et al.* TRADD contributes to tumour suppression by regulating ULF-dependent p19Arf ubiquitylation. *Nat. Cell Biol.* **14**, 625–633 (2012).
196. Chen, D. *et al.* Differential effects on ARF stability by normal versus oncogenic levels of c-Myc expression. *Mol. Cell* **51**, 46–56 (2013).
197. Chen, D., Yoon, J.-B. & Gu, W. Reactivating the ARF-p53 axis in AML cells by targeting ULF. *Cell Cycle Georget. Tex* **9**, 2946–2951 (2010).
198. Gao, P., Jin, Z., Cheng, Y. & Cao, X. RNA-Seq analysis identifies aberrant RNA splicing of TRIP12 in acute myeloid leukemia patients at remission. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35**, 9585–9590 (2014).

199. Cai, J.-B. *et al.* Ubiquitin-specific protease 7 accelerates p14(ARF) degradation by deubiquitinating thyroid hormone receptor-interacting protein 12 and promotes hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology*. **61**, 1603–1614 (2015).
200. Horvat, A. *et al.* Helicobacter pylori pathogen regulates p14ARF tumor suppressor and autophagy in gastric epithelial cells. *Oncogene* **37**, 5054–5065 (2018).
201. Mailand, N. *et al.* RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* **131**, 887–900 (2007).
202. Doil, C. *et al.* RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**, 435–446 (2009).
203. Gudjonsson, T. *et al.* TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* **150**, 697–709 (2012).
204. Wang, L. *et al.* TRIP12 as a mediator of human papillomavirus/p16-related radiation enhancement effects. *Oncogene* **36**, 820–828 (2017).
205. Zhu, Q., Sharma, N., He, J., Wani, G. & Wani, A. A. USP7 deubiquitinase promotes ubiquitin-dependent DNA damage signaling by stabilizing RNF168. *Cell Cycle*. **14**, 1413–1425 (2015).
206. Li, M., Brooks, C. L., Kon, N. & Gu, W. A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol. Cell* **13**, 879–886 (2004).
207. Liu, X. *et al.* Trip12 is an E3 ubiquitin ligase for USP7/HAUSP involved in the DNA damage response. *FEBS Lett.* **590**, 4213–4222 (2016).
208. Felsenfeld, G. & Groudine, M. Controlling the double helix. *Nature* **421**, 448–453 (2003).
209. Trotter, K. W. & Archer, T. K. Nuclear receptors and chromatin remodeling machinery. *Mol. Cell. Endocrinol.* **265–266**, 162–167 (2007).
210. Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E. & Workman, J. L. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1899–1910 (2000).

211. Keppler, B. R. & Archer, T. K. Ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent control of subunit stoichiometry in the SWI/SNF complex. *J. Biol. Chem.* **285**, 35665–35674 (2010).
212. Simone, C. SWI/SNF: the crossroads where extracellular signaling pathways meet chromatin. *J. Cell. Physiol.* **207**, 309–314 (2006).
213. Kajiro, M. *et al.* The E3 ubiquitin ligase activity of Trip12 is essential for mouse embryogenesis. *PloS One* **6**, e25871 (2011).
214. Zhu, S. *et al.* Mapping and characterizing N6-methyladenine in eukaryotic genomes using single-molecule real-time sequencing. *Genome Res.* **28**, 1067–1078 (2018).
215. Kweon, S.-M. *et al.* An Adversarial DNA N6-Methyladenine-Sensor Network Preserves Polycomb Silencing. *Mol. Cell* **74**, 1138-1147.e6 (2019).
216. Wang, H. *et al.* Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873–878 (2004).
217. Kirmizis, A. *et al.* Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev.* **18**, 1592–1605 (2004).
218. Scheuermann, J. C. *et al.* Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* **465**, 243–247 (2010).
219. Kloet, S. L. *et al.* The dynamic interactome and genomic targets of Polycomb complexes during stem-cell differentiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 682–690 (2016).
220. Hoischen, A. *et al.* De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat. Genet.* **43**, 729–731 (2011).
221. Bramswig, N. C. *et al.* Identification of new TRIP12 variants and detailed clinical evaluation of individuals with non-syndromic intellectual disability with or without autism. *Hum. Genet.* **136**, 179–192 (2017).
222. An, C.-I., Ganio, E. & Hagiwara, N. Trip12, a HECT domain E3 ubiquitin ligase, targets Sox6 for proteasomal degradation and affects fiber type-specific gene expression in muscle cells. *Skelet. Muscle* **3**, 11 (2013).

223. Doco-Fenzy, M. *et al.* Deletion 2q36.2q36.3 with multiple renal cysts and severe mental retardation. *Eur. J. Med. Genet.* **51**, 598–607 (2008).
224. O’Roak, B. J. *et al.* Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat. Commun.* **5**, 5595 (2014).
225. Lelieveld, S. H. *et al.* Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nat. Neurosci.* **19**, 1194–1196 (2016).
226. Zhang, J. *et al.* Haploinsufficiency of the E3 ubiquitin-protein ligase gene TRIP12 causes intellectual disability with or without autism spectrum disorders, speech delay, and dysmorphic features. *Hum. Genet.* **136**, 377–386 (2017).
227. Yoo, N. J., Park, S. W. & Lee, S. H. Frameshift mutations of ubiquitination-related genes HERC2, HERC3, TRIP12, UBE2Q1 and UBE4B in gastric and colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Pathology (Phila.)* **43**, 753–755 (2011).
228. Hein, R. *et al.* A genome-wide association study to identify genetic susceptibility loci that modify ductal and lobular postmenopausal breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy use: a two-stage design with replication. *Breast Cancer Res. Treat.* **138**, 529–542 (2013).
229. Li, G. *et al.* Identification of mutant genes with high-frequency, high-risk, and high-expression in lung adenocarcinoma. *Thorac. Cancer* **5**, 211–218 (2014).
230. Cacheux, W. *et al.* Exome sequencing reveals aberrant signalling pathways as hallmark of treatment-naïve anal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **9**, 464–476 (2018).
231. Masui, T. *et al.* Replacement of Rbpj with Rbpjl in the PTF1 complex controls the final maturation of pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **139**, 270–280 (2010).
232. Krapp, A. *et al.* The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev.* **12**, 3752–3763 (1998).
233. Krah, N. M. *et al.* Prevention and Reversion of Pancreatic Tumorigenesis through a Differentiation-Based Mechanism. *Dev. Cell* (2019). doi:10.1016/j.devcel.2019.07.012

234. Whitfield, M. L. *et al.* Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1977–2000 (2002).
235. Chen, W., Smeekens, J. M. & Wu, R. Systematic study of the dynamics and half-lives of newly synthesized proteins in human cells. *Chem. Sci.* **7**, 1393–1400 (2016).
236. Georges, A., Marcon, E., Greenblatt, J. & Frappier, L. Identification and Characterization of USP7 Targets in Cancer Cells. *Sci. Rep.* **8**, 15833 (2018).
237. Ma, H. *et al.* M phase phosphorylation of the epigenetic regulator UHRF1 regulates its physical association with the deubiquitylase USP7 and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4828–4833 (2012).
238. van der Lee, R. *et al.* Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **114**, 6589–6631 (2014).
239. Romero, P. *et al.* Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* **42**, 38–48 (2001).
240. Hansen, J. C., Lu, X., Ross, E. D. & Woody, R. W. Intrinsic protein disorder, amino acid composition, and histone terminal domains. *J. Biol. Chem.* **281**, 1853–1856 (2006).
241. Krois, A. S., Ferreón, J. C., Martínez-Yamout, M. A., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Recognition of the disordered p53 transactivation domain by the transcriptional adapter zinc finger domains of CREB-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1853–E1862 (2016).
242. Zhou, H. X. The affinity-enhancing roles of flexible linkers in two-domain DNA-binding proteins. *Biochemistry* **40**, 15069–15073 (2001).
243. Sabari, B. R. *et al.* Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* **361**, (2018).
244. Giunta, S. & Jackson, S. P. Give me a break, but not in mitosis: the mitotic DNA damage response marks DNA double-strand breaks with early signaling events. *Cell Cycle Georget. Tex* **10**, 1215–1221 (2011).
245. Maréchal, A. *et al.* PRP19 transforms into a sensor of RPA-ssDNA after DNA damage and drives ATR activation via a ubiquitin-mediated circuitry. *Mol. Cell* **53**, 235–246 (2014).

246. Kozlov, A. G. *et al.* Intrinsically disordered C-terminal tails of E. coli single-stranded DNA binding protein regulate cooperative binding to single-stranded DNA. *J. Mol. Biol.* **427**, 763–774 (2015).
247. Shinn, M. K., Kozlov, A. G., Nguyen, B., Bujalowski, W. M. & Lohman, T. M. Are the intrinsically disordered linkers involved in SSB binding to accessory proteins? *Nucleic Acids Res.* (2019). doi:10.1093/nar/gkz606
248. Braden, W. A., McClendon, A. K. & Knudsen, E. S. Cyclin-dependent kinase 4/6 activity is a critical determinant of pre-replication complex assembly. *Oncogene* **27**, 7083–7093 (2008).
249. Smith, O. K. & Aladjem, M. I. Chromatin structure and replication origins: determinants of chromosome replication and nuclear organization. *J. Mol. Biol.* **426**, 3330–3341 (2014).
250. Cohen, S. M. *et al.* BRG1 co-localizes with DNA replication factors and is required for efficient replication fork progression. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6906–6919 (2010).
251. Iconomou, M. & Saunders, D. N. Systematic approaches to identify E3 ligase substrates. *Biochem. J.* **473**, 4083–4101 (2016).
252. Roux, K. J., Kim, D. I., Burke, B. & May, D. G. BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **91**, 19.23.1-19.23.15 (2018).
253. Vader, G., Maia, A. F. & Lens, S. M. The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond. *Cell Div.* **3**, 10 (2008).
254. Pinsky, B. A., Kung, C., Shokat, K. M. & Biggins, S. The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat. Cell Biol.* **8**, 78–83 (2006).
255. Ciferri, C. *et al.* Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex. *Cell* **133**, 427–439 (2008).
256. DeLuca, K. F., Lens, S. M. A. & DeLuca, J. G. Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis. *J. Cell Sci.* **124**, 622–634 (2011).

257. Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M. & Desai, A. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* **127**, 983–997 (2006).
258. Mayer, T. U. *et al.* Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* **286**, 971–974 (1999).
259. Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L. & Mitchison, T. J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* **150**, 975–988 (2000).
260. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 7–34 (2019).
261. Duconseil, P. *et al.* Transcriptomic analysis predicts survival and sensitivity to anticancer drugs of patients with a pancreatic adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **185**, 1022–1032 (2015).
262. Dufresne, M. *et al.* Id3 modulates cellular localization of bHLH Ptf1-p48 protein. *Int. J. Cancer* **129**, 295–306 (2011).
263. Erdel, F. & Rippe, K. Formation of Chromatin Subcompartments by Phase Separation. *Biophys. J.* **114**, 2262–2270 (2018).
264. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A. & Rosen, M. K. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 285–298 (2017).
265. Cao, Q. *et al.* The central role of EED in the orchestration of polycomb group complexes. *Nat. Commun.* **5**, 3127 (2014).

ABSTRACT in english :

TRIP12 is an E3 ubiquitin ligase that belongs to the HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*) family. Several proteins are targeted by TRIP12 polyubiquitination which triggers their proteasomal degradation. Among its targets, several proteins are involved in DNA damage responses, chromatin remodelling and p53 pathway activation. Unpublished results of my team showed an increased expression of TRIP12 in pancreatic cancer and pre-neoplastic lesions. My group revealed that TRIP12 polyubiquitinates and provokes the degradation of the transcription factor PTF1a (*Pancreas Transcription Factor 1a*) stability. Describing for the first time a post-translational regulation of PTF1a. PTF1a is essential in pancreatic development and homeostasis. It inhibits the proliferation of pancreatic cells and is considered as a tumour suppressor gene and. Even if several TRIP12 targets are involved in cellular processes that are tightly cell cycle regulated, the regulation of TRIP12 expression and its functions during the cell cycle was unknown at the beginning of my thesis. I showed that TRIP12 expression and nuclear localization are regulated throughout the cell cycle. I identified an intrinsically disordered domain within the N-terminal region of TRIP12 that permits its interaction to euchromatin. I demonstrated TRIP12 implication in mitosis entry by controlling DNA replication timing Independently of its catalytic activity. TRIP12 is also required for maintaining a correct mitotic progression and chromosomes stability. My results propose TRIP12 as a new chromatin-associated protein that is essential for cell cycle progression and to preserve genome integrity.

In the end, my studies will be fundamental to explain the increased expression of TRIP12 protein observed in pancreatic cancer and its impact in carcinogenesis.

KEYWORDS : E3 ubiquitin ligase, DNA binding, Cell cycle, TRIP12, Mitosis, Chromosome stability

